

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2001년 제 19645 호
Application Number PATENT-2001-0019645

출원년월일 : 2001년 04월 12일
Date of Application APR 12, 2001

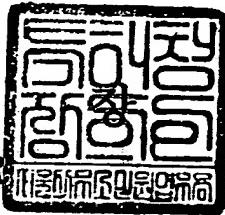
출원인 : 류왕식
Applicant(s) RYU, WANG-SHICK



2001 년 07 월 11 일

특허청

COMMISSIONER



【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2001.04.12
【발명의 명칭】 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터
【발명의 영문명칭】 Hepatitis B virus vectors for gene therapy
【출원인】
 【성명】 류왕식
 【출원인코드】 4-2000-007603-9
【대리인】
 【성명】 이후동
 【대리인코드】 9-1998-000649-0
 【포괄위임등록번호】 2000-021928-8
【발명자】
 【성명】 류왕식
 【출원인코드】 4-2000-007603-9
【발명자】
 【성명의 국문표기】 이제한
 【성명의 영문표기】 LEE, Je Han
 【주민등록번호】 730504-1155729
 【우편번호】 411-311
 【주소】 경기도 고양시 일산구 강선마을 108동 1404호
 【국적】 KR
【우선권주장】
 【출원국명】 KR
 【출원종류】 특허
 【출원번호】 10-2000-0021070
 【출원일자】 2000.04.20
 【증명서류】 첨부
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
 【서열개수】 5
 【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이후동 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	56	면	56,000 원
【우선권주장료】	1	건	26,000 원
【심사청구료】	19	항	717,000 원
【합계】			828,000 원
【감면사유】			개인 (70%감면)
【감면후 수수료】			266,600 원
【첨부서류】			1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간 세포에만 특이적으로 감염하여 이종 유전자를 전달 및 발현할 수 있는 유전자 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다. B형 간염 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하므로 본 발명에서 제공하는 재조합 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하여 치료용 유전자를 전달하는 특성이 있으므로 *in vivo* 치료가 가능한 장점이 있다. 본 발명에서 제공하는 벡터는 바이러스의 복제에 필요한 시스-엘리먼트는 갖고 있으나 복제에 필요한 바이러스 단백질의 ORF(open reading frame)가 결손되어 이를 발현할 수 없으므로 복제 가능한 B형 간염 바이러스를 생산할 가능성은 없다. 하지만, 복제에 필수적인 코아 단백질 및 폴리머라제가 제공되면 야생형과 마찬가지로 유전자 복제가 일어나므로 재조합 바이러스의 생산이 가능하다. 본 발명에 의하여 생산된 이종 유전자가 삽입된 재조합 바이러스는 *in vivo*혹은 *ex vivo* 유전자 치료 프로토콜에 의해 환자의 간세포에 치료용 유전자를 전달할 수 있다.

【대표도】

도 8

【색인어】

B형 간염 바이러스, 재조합 플라스미드 벡터, 유전자 치료

【명세서】**【발명의 명칭】**

유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터{Hepatitis B virus vectors for gene therapy}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 도식화한 그림으로, 다음의 cis-element가 표시되어 있다: DR1 (direct repeat 1), DR2 (direct repeat 2), epsilon (encapsidation signal), r (repeat) element, PRE (posttranscriptional RNA processing element). 또한, 네 개의 ORF를 화살표 박스 그림으로 표시하고 있다: C (core) ORF, P (polymerase) ORF, S (surface antigen), 및 X ORF.

도 2는 B형 간염 바이러스의 감염주기를 나타낸 그림.

도 3은 바이러스의 폴리머라제가 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 역전사 과정을 통해 B형 간염 바이러스의 유전자 복제과정을 도식화한 그림.

도 4는 이종 유전자(GFP)가 삽입된 HBV 재조합 벡터의 세포 내에서의 작용을 요약 한 그림으로 HBV 재조합 바이러스의 복제에 필요한 바이러스 단백질이 제공되는 packaging cell line에 트랜스펙션시켜 세포내 핵에서 CCC (covalently closed circular) 형태의 DNA로 복구되어 야생형과 마찬가지로 이종유전자를 가진 HBV 재조합 벡터에서의 이종유전자 발현과정을 도식화한 그림이다. Packaging cell line은 헬퍼 플라스미드로 대치할 수 있다.

도 5a는 R015 플라스미드(B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드)를 제조하기 위한 도식도.

도 5b는 R015 플라스미드(B형 간염 바이러스의 프리게노믹 RNA를 발현하는 플라스미드)의 그림.

도 6은 B형 간염 바이러스의 유전자 중 시스-엘리먼트를 규명하기 위하여 제작한 결손 변이체의 결손 위치 요약한 그림으로, 결손부위를 굵은 선으로 표시. 왼쪽아래의 삽입된 그림은 DR2, DR1부위를 확대한 도면.

도 7은 B형 간염 바이러스 결손 변이체의 복제 여부를 HBV 프루브(probe)로 써던 블렛한 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 8은 원형(prototype)의 HBV 재조합 벡터의 지도로 B형 간염 바이러스의 복제에 필요한 새로운 시스-엘리먼트(알파와 베타)와 이종 유전자 삽입 가능 부위와 삽입가능 유전자 크기를 도식화한 것.

도 9는 이종 유전자인 녹색형광단백질(GFP; green fluorescent protein)가 삽입된 HBV 재조합 벡터 (R711 플라스미드)를 제조하기 위한 과정을 나타낸 도식도.

도 10은 시스-엘리먼트를 포함한 이종 유전자로 녹색형광단백질 (GFP; green fluorescent protein)가 삽입된 HBV 재조합 벡터(R711 플라스미드와 R712 플라스미드)의 도식도. R711 플라스미드는 야생형보다 약 0.6 K bp 작은 유전자를 갖는 재조합 HBV를 생산하게되며, R712 플라스미드는 야생형과 같은 크기의 유전자를 갖는 재조합 HBV를 생산하게된다.

도 11a는 이종 유전자로 녹색형광단백질(GFP)가 삽입된 HBV 재조합 벡터 R711(pCMV-HBV/GFP)의 복제 여부를 HBV 프루브로 확인한 써던 블렛 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

도 11b는 녹색형광단백질(GFP)이 삽입된 HBV 재조합 벡터 R711(pCMV-HBV/GFP)의 복제 여부를 GFP 프루브로 확인한 써던 블렛 결과이며, 여기서 RC(relaxed circular DNA), DL(double-strand linear DNA), SS(single-stranded DNA)는 각각 HBV 유전자 복제의 중간체.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<14> 본 발명은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 간세포에만 특이적으로 적중하여 *in vivo* 또는 *ex vivo* 유전자 치료로 사용할 수 있는 재조합 B형 간염 바이러스 벡터에 관한 것이다.

<15> 일반적으로 유전자 치료는 세포내의 유전자 발현의 이상으로 인한 많은 질환을 근본적으로 치유할 수 있어서 차세대 치료요법으로 인식되고 있다 (Anderson, W. F., Science 256:808-813, 1992). 유전자 치료법은 아직 상업화되지 않았지만 게놈프로젝트의 완성으로 그 중요성이 더욱 부각되어 많은 바이오텍 회사와 대학병원에서 관심을 갖고 연구 개발이 진행되고 있다 (Mulligan, R. C., Science 260: 926-932, 1993). 현재 유전자 치료는 크게 레트로바이러스 또는 아데노바이러스 등의 바이러스를 이용한 바이

러스벡터나 리포좀 또는 naked DNA등을 이용한 비 바이러스성 벡터 (nonviral vector)로 분류할 수 있다 (Friedmann, T. ed., *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999). 이종 유전자 (heterologous gene)를 치료용 목적으로 이용하는데 있어서 중요한 목표는 목적하는 세포에 특이적으로 적중하는 것과 치료효과의 지속성이다. 그러나 세포 특이성의 결핍과 비효율적인 유전자 전달은 유전자 치료의 주요 개선점으로 대두되어 왔다. 뿐만 아니라 증상이 완화되거나 완치될 때까지 치료용 유전자 산물의 효과가 지속될 수 있게 하는 것도 중요한 문제이고, 대부분의 벡터가 세포에서 소멸 및 분해되는 지속성의 부족도 문제가 되어 그 효과를 더욱 낮게 하는 문제점이 있었다 (Crystal et al., *Science* 270:404-410, 1995).

<16> 현재 주로 사용되고 있는 유전자 전달시스템은 유전자의 효율적인 전달을 위하여 바이러스에서 유래한 벡터들을 주로 사용한다. 특히, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노부속바이러스(adeno-associated viruses; AAV)등이 주로 사용된다 (Friedmann, T. ed., *The Development of Human Gene Therapy*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999). 이들은 병원성이 없으며 바이러스 종식으로 인한 위험을 방지하기 위하여 복제능 (replication defective)이 없게 고안된 바이러스 벡터이다. 그러나 이들 바이러스 유래 벡터는 대상세포에 효율적으로 유전자를 전달하여 발현하기에는 이상적이지 못한 단점이 있다. 우선, 레트로바이러스는 대상세포의 게놈에 통합 (integration)되어 지속적으로 발현하는

장점이 있지만, 낮은 타이터 (titer)와 단지 분열하는 세포 (dividing cells)의 계놈에만 통합하는 제한성으로 인하여 *in vivo* 치료에는 사용되기 어렵다. 반면, 아데노바이러스는 매우 높은 타이터 (titer)와 효율적인 유전자 전달능력 그리고 분열하지 않은 세포 (nondividing cells)에도 유전자를 전달하는 장점이 있다. 그러나 발현이 지속적이지 못하고 숙주에 면역반응을 유발하는 문제점이 있다. 더군다나, 치료효과를 유도하기 위하여 필수적으로 수반되는 반복적인 투여는 극심한 면역반응을 유발하는 부작용이 있다. 이러한 문제점 때문에 레트로바이러스와 아데노바이러스벡터는 임상적으로 사용되기는 많은 개선이 필요하다. 또한, 현재 임상연구에서 가장 많이 사용되는 레트로바이러스와 아데노바이러스 벡터는 세포특이성이 없어 차료대상조직 뿐 아니라 기타 조직에도 감염되므로 *in vivo therapy*에는 부작용이 수반되는 문제가 있다.

<17> 상기의 바이러스벡터로는 조직특이성, 간 세포특이성 등등이 없으므로, 간 질환에는 *in vivo* 프로토콜은 부작용 등으로 제한되며 주로 *ex vivo* 프로토콜이 사용된다. *ex vivo* 프로토콜에 의한 간 적중 치료는 외과적인 적출 수술이 필수이므로 재조합 바이러스 벡터를 처리하여 만든 변형된 간세포(치료능력을 가진 간세포)를 환자의 간, 비장으로 형질도입 (transduction)이 불가피하게 된다. 하지만, 이러한 적출된 간세포를 실험실내 배양하기에는 많은 어려움과 복잡함, 그리고 막대한 비용을 필요로 하게된다.

<18> 바람직하게는 간적중 유전자치료벡터는 간세포에만 특이적으로 전달되어야 할 것이다. HBV와 같이 간향성 (hepatotropic) 바이러스에서 유래된 유전자치료벡

터는 혈관 내 주사 또는 야생형 바이러스가 이용하는 간세포의 수용체를 이용하여 환자 내로 주입할 수 있다. HBV에서 유래한 간 적증 치료용 백터의 개발에는 HBV 복제기전에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정보가 선행되어야 하며, 시스-엘리먼트에 대한 완전한 규명 없이는 백터로의 이용은 매우 제한적이다.

<19> HBV는 헤파드나바이러스과 (hepadnaviridae)에 속하며 숙주 특이성과 조직 특이성을 가진 작은 DNA 바이러스이다. 헤파드나바이러스는 인간(HBV), 북미산 우드Chuck (woodchuck; WHV), 북미산 얼룩다람쥐 (GSHV)같은 포유동물과 북경오리 (DHBV), 회색 해오라기(HHBV)같은 조류에서도 발견되고 있다 (Ganem, D., 'Hepadnaviridae and Their Replication,' in *Fundamental Virology*, 3rd edition, Fields et al., Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996).

<20> 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 백터의 개발에 있어서 어려웠던 문제점은 바이러스의 복제기전에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정확한 정보를 알지 못했던 점이다. 그러므로, HBV 게놈 전체에 걸친 시스-엘리먼트에 대한 정보가 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 백터의 개발에 있어서 꼭 선행되어야 할 부분일 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 백터를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<22> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HBV 게놈 복제에 필수적인 새로운 두 가지의 시스-엘리먼트인 서열목록 1에 기재된 알파-엘리먼트 (nt. 2818-3052) 및 서열목

록 2에 기재된 베타(β)-엘리먼트(nt. 1607-1804)서열을 포함하는 원형(prototype)의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터를 제공한다.

<23> 본 발명의 벡터는 5' 쪽에서부터 3' 쪽까지의 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터(immediate early promoter), DR1 엘리먼트, 앵실론 엘리먼트(epsilon, nt. 1849-1909), 제 1항의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052), DR2 엘리먼트, 제 1항의 베타-엘리먼트(nt. 1607-1804), DR1 엘리먼트를 포함하는 서열목록 3에 기재된 원형(prototype)의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터인 것이 바람직하다.

<24> 서열목록 3에서 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터(immediate early promoter)는 염기서열 7408에서 7999이며, DR1 엘리먼트는 7에서 17, 앵실론 엘리먼트(epsilon, nt. 1849-1909)는 30에서 90, 제 1항의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052)는 998에서 1233이며, DR2 엘리먼트는 2955에서 2965이며, 제 1항의 베타-엘리먼트(nt. 1607-1804)는 2970에서 3167이고, DR1 엘리먼트는 3189에서 3199이며, 91에서 997까지와 1233에서 2954까지에 각각 약 0.9kb와 약 1.7kb의 외래 유전자가 삽입된 수 있는 부위가 존재한다.

<25> 즉, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터는 상기의 앵실론(nt. 1849-1909)과 상기의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052) 사이와 상기의 알파-엘리먼트(nt. 2818-3052)와 상기의 DR2(nt. 1592-1602) 사이에 외래 유전자 삽입 부위가 존재한다(도 8참조).

<26> 또, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터에 있어서, 상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터를 사용하며, 내부바이러스 프로모터 중에서 코아 프로모터와 프리 S2/S 프로모터를 각각 선택하여 사용하는 것이 바람직하다.

- <27> 또한, 본 발명의 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 엡실론 엘리먼트와 알파 엘리먼트 사이에 0.90 K bp까지 삽입할 수 있고, 알파 엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이에 1.7 K bp까지 삽입할 수 있는 벡터이다.
- <28> 또한, 본 발명의 벡터에 있어서, 상기의 벡터는 복제에 필수적인 코아 단백질 혹은 폴리머라제 유전자가 결손된 복제불능 (replication-defective)인 벡터이다.
- <29> 본 발명의 벡터는 적어도 한 개의 이종유전자 (heterologous gene)를 발현할 수 있는 이종 염기서열을 포함하는 벡터이다.
- <30> 또 본 발명은 B형 간염바이러스의 캡시드화에 필수적인 '엡실론' 엘리먼트가 결손되어 복제할 수 없지만 B형 간염바이러스의 단백질을 발현하여, 재조합 HBV 벡터에 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors)을 발현하는 헬퍼 플라스미드 (helper plasmid)를 제공한다.
- <31> 또한, 본 발명은 상기의 재조합 HBV 벡터와 상기의 헬퍼 플라스미드를 간 세포주에 함께 트랜스팩션하여 재조합 HBV 입자를 만들 수 있는 방법을 제공한다.
- <32> 상기의 재조합 HBV 벡터는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 포함하며, 적어도 한 개의 유전자 치료용 이종유전자를 발현할 수 있으며, 또한 바이러스 유전자 복제에 필요한 바이러스 유전자 중 적어도 한가지를 발현할 수 없으며, 상기의 헬퍼 플라스미드(helper plasmid or packaging plasmid)는 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors) 중 적어도 한가지를 발현할 수 없는 재조합 HBV 벡터에게 이 결핍된 단백질을 제공하여 재조합 HBV 벡터를 보완 (complementation) 하여 감염

성있는 바이러스를 생산할 수 있어야 하고, 상기의 간 세포주는 복제에 필요한 단백질 (trans-acting factors) 이 제공되면 재조합 HBV 벡터가 복제할 수 있는 간 세포주이다.

<33> 본 발명에서 간세포는 인간의 간세포, 조류의 간세포, 설치류의 간세포의 집단으로부터 선택된 간세포인 것이 바람직하다.

<34> 또한, 본 발명은 상기의 재조합 HBV 입자를 혈관 내 또는 간 조직 내 투여 방법으로 표적세포(target cell)에 감염시키는 방법을 제공한다.

<35> 표적세포에 감염시키는 방법에 있어서, 위에 언급한 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스(anti-sense) 유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스(anti-sense)유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 (tumor suppressor) 유전자, 성장 인자 (growth factor), 호르몬 (hormones), 사이토카인 (cytokine), 세포막 수용체 (cellular receptors), 혈액 응고 인자로 구성된 이종 유전자를 포함한다.

<36> 또, 재조합 HBV 입자를 표적세포 (target cell)에 감염시키는 방법으로 다음을 포함한다. HBV에 만성 감염된 환자의 간 조직내로 직접 재조합 HBV 벡터 DNA의 주입방법을 포함하며, 위에 언급한 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스(anti-sense) 유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스(anti-sense)유전자와 라이보자임 (ribozyme)을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 (tumor suppressor) 유전자, 성장 인자,

(growth factor), 호르몬 (hormones), 사이토카인 (cytokine), 세포막 수용체 (cellular receptors), 혈액 응고 인자로 구성된 이종 유전자를 포함한다.

<37> 본 발명의 이해를 돋기 위하여 다음의 용어를 아래와 같이 정의한다.

<38> '엘리먼트 (element)'는 DNA 혹은 RNA의 염기서열로서 특정한 기능을 갖는 염기서열을 말한다. '시스-엘리먼트 (cis-acting element)'는 동일 DNA 혹은 RNA 분자내에서 조절기능을 갖고 작용하는 염기서열을 말한다. '캡시드화 (encapsidation)'는 '팩키징 (packaging)'과 같은 의미로 사용되었으며, 코아 입자내로 바이러스 유전자 (DNA 혹은 RNA)가 들어가는 과정을 말한다. '이종유전자 (heterologous sequence or gene)'은 HBV 유전자가 아닌 유전자를 말하며, '외부유전자 (foreign gene)'와 동일한 의미로 사용되었다.

<39> '벡터'는 DNA 절편을 포함하여 다른 세포로 운반하는 기능이 있는 핵산염기서열을 말하며, 원형의 벡터는 이종 유전자를 삽입할 수 있어 일반적으로 사용할 수 있는 벡터를 말한다.

<40> 본 발명에서 HBV의 염기서열은 두 가지로 표시되어 있다. 우선, 명세서의 본문에서는 특별히 지적하지 않은 경우에는 모두 Galibert의 방법에 따라 HBV 염기서열을 표시하였다 (Galibert et al, Nature 28: 646-650, 1979). 이 경우 nt.----로 표시하였다. 한편, 첨부한 염기서열 목록은 프리게노믹 RNA의 개시부위인 nt. 1820을 1로 하여 각각 플라스미드의 염기서열을 표시하였다.

<41> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

<42> I. B형 간염 바이러스(HBV)

<43> B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 헤파드나바이러스에 속하며 급성 간염 뿐 아니라, 만성 간염을 일으키는 임상적으로 매우 중요한 바이러스이다. 우드척 간염 바이러스 (WHV), 얼룩 다람쥐 간염 바이러스 (GSHV), 오리 간염 바이러스 (DHBV) 등이 헤파드나바이러스과에 속한다 (Ganem, D., 'Hepadnaviridae and Their Replication,' in *Fundamental Virology*, 3rd edition, Fields et al., Lippincott-Raven Press, Philadelphia, 1996). HBV는 DNA 바이러스이지만 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 HBV DNA 중합효소가 가지고 있는 역전사활성 (reverse transcriptase activity)을 통하여 DNA 유전자로 복제하는 매우 특이한 복제기전을 가지고 있는 바이러스이다. HBV는 약 3.2 k bp의 플러스-DNA 가닥에 틈(gap)이 존재하는 원형의 DNA 유전자를 갖고 있으며, 코아 (C), 폴리머라제 (P), 표면항원 (S), 그리고 X 단백질의 네 개의 바이러스 단백질을 갖고 있다.

<44> II. 헤파드나바이러스(Hepadnavirus)의 감염주기

<45> 헤파드나바이러스의 감염주기는 도면 2에 표시되어 있다. 헤파드나바이러스는 수용체(receptor-mediated endocytosis)를 통해 간세포에 침입한다고 알려져 있다. 간세포로 들어온 후, 틈 (gap)이 존재하는 HBV 게놈은 전사(transcription)의 주형 (template)이 되는 covalently closed circular DNA (ccc DNA)로 전환된다. 네 개의 바이러스의 전사체가 합성된 후 세포질로 이동된다. 3.5 Kbp의 프리게노믹 RNA는 코아와 폴리머라제의 mRNA로서 작용할 뿐 아니라 바이러스 유전자 복제의 주형으로도 작용한다.

<46> III. 역전사 (reverse transcription) 과정

<47> HBV는 레트로바이러스와는 다른 역전사 과정을 가진다 (Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773, 1996). HBV는 바이러스 복제를 위해 코아 단백질(core protein)과 프리게노믹 RNA를 인식하는 폴리머라제가 함께 코아 입자로 캡시드화된 후 이 코아 입자 안에서 폴리머라제에 의한 유전자 복제가 일어난다. 폴리머라제 단백질과 프리게노믹 RNA의 결합이 유전자 복제에 필수적인 코아 입자 형성에 중요하다. 프리게노믹 RNA의 5' 쪽 말단 부위에 존재하는 '엡실론'이라고 불리는 약 85 염기쌍 (base pairs)의 특이한 2차구조의 염기서열이 캡시드화 단계에서 시스-엘리먼트로 작용한다 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65:3309-3316, 1991). 이 엡실론은 스템-루프 구조(stem-loop structure)를 이루며, 헤파드나바이러스에 속하는 모든 바이러스에 매우 높게 보존되어 있다.

<48> HBV 폴리머라제의 역전사 과정은 HBV의 독특한 계놈 구조만큼 매우 복잡하다 (도면 3; Nassal et al., J. Viral Hepatitis 3: 217-226, 1996). 야생형의 완전한 이중-가닥 DNA 계놈을 형성하기 위해서는 아래와 같은 주형 스위칭 과정(template switching)이 필요하다 (도면 3). 첫째, 코아 입자 안에 캡시드화된 프리게노믹 RNA를 주형으로 하여 HBV의 DNA 폴리머라제가 역전사 과정으로 마이너스- 가닥 DNA를 합성한다. 이 마이너스-가닥 DNA 합성의 프라이머와 폴리머라제로 동시에 HBV의 DNA 폴리머라제가 이용된다. (Wang et al., J. Virol. 67:6507-6512, 1993) 즉, 단백질-프라이밍 (protein-priming)에 의하여 마이너스-가닥 DNA 합성이 개시된다. 이 프라이밍 과정에서 5'에 존재하는 엡실론(ε)이 HBV 마이너스-가닥 DNA 합성의 개시부위 (initiation

site)로 작용한다 (Pollack et al., J. Virol. 68: 5579-5587, 1994). 다음, 이 마이너스-가닥 DNA는 엡실론과 DR1(direct repeat) 사이의 4 염기쌍의 상동성 (homology)을 이용하여 5'에서 3' DR1로 이동한다 (Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773, 1996). 이 과정을 마이너스-가닥 이동 (minus-strand translocation)이라고 부른다. 마이너스-가닥 DNA가 합성되면서 HBV 폴리머라제가 갖고있는 RNase H 활성에 의해 프리게노믹 RNA는 5'-말단 쪽의 18 뉴클레오타이드 RNA만을 제외하고는 분해된다 (Loeb et al., EMBO J. 10:3533-3540, 1991). 다음, 5'-말단 캡 RNA가 3' DR2로 전달된 후 RNA 헤라이머로 작용하여 플러스-가닥 DNA를 합성한다. 이어서 DR2 부위로 주형 스위칭 (template switching)을 하여 플러스-가닥 DNA 합성을 시작하고, 플러스-가닥 DNA는 DR2로 이동 (translocation)되는 원형화 (circularization) 단계를 거쳐 원형의 게놈을 합성한다 (Loeb et al., J. Virol. 71:152-160, 1997). 이 플러스-가닥 DNA의 합성이 완결되기 전에 HBV DNA는 바이러스 표면항원입자에 쌓여 세포 밖으로 나간다. 결국, HBV는 원형의 틈이 존재하는 이중-가닥 게놈을 갖게된다.

<49> IV. HBV 게놈 복제에 필수적인 시스-엘리먼트

<50> 위에서 기술되어있듯이, HBV는 세 번의 주형스위칭 (template switching)을 통하여 선형의 프리게노믹 RNA를 원형의 이중가닥 DNA로 복제한다. 지난 20년간, 분자생물학적인 기법으로 바이러스 DNA 복제에 중요한 역할을 하는 엘리먼트를 밝혀냈다 (Nassal et al., J. Viral Hepatitis 3: 217-226, 1996). 문헌에 보고된 시스-엘리먼트를 나열해 보면, 캡시드화 신호로 이용되는 5'쪽 엡실론 엘리먼트가 알려졌고 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65:3309-3316, 1991), 바이러

스 복제 단계 중에 프라이머 이동(translocation) 과정에서 이용되는 DR1과 DR2 (Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992), 원형화(circularization) 단계에서 이용되는 r(repeat)가 작용한다 (Loeb et al., J. Virol. 71:152-160, 1997). 그리고, posttranscriptional RNA processing element (PRE) 등이 있다 (Huang et al., Mol. Cell. Biol. 15:3864-3869, 1995). 이러한 시스-엘리먼트는 대부분 HBV 프리게놈의 양쪽에 존재한다 (도면 1과 도면 8). 한편, Hepadnavirus중에서 DHBV (Duck hepatitis B virus)의 경우, 3E, M, 5E라고 명명된 세 개의 엘리먼트가 유전자 복제에 필요함이 보고되었으며, 플러스-가닥 DNA를 합성시 주형 스위칭(template switching)에 필요하다 (Havert et al., J. Virol. 71: 5336-5344, 1997). DHBV와는 달리, HBV는 아직 복제에 필요한 시스-엘리먼트가 규명되지 않았다. 이러한 이유로, HBV 게놈은 유전자 치료용 벡터로 이용되지 못하고 있다. 유전자 치료 벡터는 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 반드시 포함하고 있어야 한다. 본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 시스-엘리먼트를 규명한 후 이 정보를 기반으로 재조합 HBV벡터를 설계하였다.

<51> V. 원형의 HBV벡터의 설계

<52> HBV 게놈 복제에 필요한 모든 시스-엘리먼트를 규명하고, 복제에 필수적인 바이러스 단백질 (trans-acting factors)가 제공된다면 복제능 (replication competent)이 존재하는 이종 유전자를 가진 유전자 치료용 벡터로 개발될 수 있을 것이다. 간단히 말하면, HBV 벡터는 바이러스 단백질은 코딩(coding)할 능력이 없으면서 바이러스 게놈 복제에 필요한 모든 시스-엘리먼트를 가지고 있는 것이다. 그럼에도 불구하고, 헬퍼(helper) 플라스미드나 패키징 세포주 (packaging cell line)를 통해 바이러스 단백질 (

예를 들자면, 코아 단백질, 폴리머라제 단백질, 표면 단백질)이 제공된다면 재조합 HBV 벡터는 복제 될 수 있다 (도면 4). 이종유전자의 삽입부위의 선정, 삽입된 이종유전자 의 크기, 이종유전자의 발현을 위해 이용되는 프로모터 (promoter) 등이 성공적인 유전자 치료용 벡터 개발의 관건이 될 수 있다.

<53> 먼저, 본 발명에서는 2개의 시스-엘리먼트를 규명하였다. 하나는 알파 엘리먼트이고 다른 하나는 베타 엘리먼트이다 (도면 8). 본 발명의 방법을 구체화하기 위해, 본 발명에서는 2개의 삽입가능 부위를 선정하였다 (도면 8). 하나는 5' 앱실론과 알파 엘리먼트 사이이고 다른 하나는 알파 엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이이다. 이 두 개의 삽입부위는 바이러스 복제에 있어 결손가능부위 (dispensable region)이다. 하지만, 삽입부위의 선정을 지금의 것으로 한정짓진 않고 원형 (prototype) HBV 벡터의 5' 앱실론과 알파-엘리먼트 사이에 이종 유전자를 삽입도 가능할 것이다 (도면 8). 삽입할 수 있는 이종 유전자의 크기는 야생형의 게놈 크기를 고정시킨다고 생각하였을 때, 각각 0.90 K bp와 1.7 Kbp까지 가능하다 (도면 8). 최근에, 야생형보다 약 0.2 K bp정도 큰 크기의 프리게노믹 RNA까지 마이너스-가닥 DNA 합성이 가능함이 보고되었다 (Ho et al., J. Virol. 74:9010-9018, 2000). 따라서, 본 발명에서는 상기의 두 군데의 삽입위치에 각각 1.1 K bp, 1.9 K bp 까지 크기의 절편의 삽입하여도 복제할 가능성을 배제하지 않는다. 다행히, 삽입부위보다 위쪽에 존재하는 두개의 내재된 바이러스 프로모터(즉, 코아 프로모터와 프리-S2/S 프로모터)를 이용하여 이종유전자가 전사되도록 설계하였다. 더 나아가서, 본 발명의 재조합 HBV벡터는 바이시스트로닉 (bicistronic) 발현벡터로 고안되어 있으므로, 두개의 삽입부위에 삽입된 이종 유전자가 동시에 발현 가능하다.

<54> 혜파드나바이러스의 간향성 (liver tropism)은 간 질환의 유전자 치료에 있어 HBV

를 이용하려는 가장 중요한 특성이다. 본 발명에서 제공하는 간 적중 HBV벡터는 간염, 간 경변, 간암 등의 간 질환 뿐 아니라, 가족성 고지혈증 (familial hypercholesterolemia), 혈액응고인자 VIII, IV가 결핍되어 발생되는 혈우병 (hemophilia)등의 간세포에 유전자 발현이 결핍되어 발생하는 대사성 유전병 치료에도 활용될 수 있다. 또한, 간 적중 HBV벡터는 만성 간염환자의 치료에도 매우 유용할 것이다. B형 간염 바이러스에 이미 감염된 만성 감염자는 바이러스의 복제에 필요한 코아 단백질과 폴리머라제가 간 세포내에 항시 발현되고있다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 HBV벡터에 치료용 유전자가 삽입된 재조합 DNA를 만성감염자의 간세포에 직접 또는 혈액 순환을 통해 주입하면 재조합 바이러스가 HBV 만성감염자의 간세포에서는 복제가 지속적으로 가능할 것이다. 이는 만성 간염 치료에 매우 효율적일 것이다.

<55> 본 발명에서는 HBV의 복제에 필수적인 B형 간염 바이러스 게놈의 시스-엘리먼트 (α -element, β -element)에 대한 정보를 제공하고 있으며, 알파 엘리먼트, 베타 엘리먼트의 뉴클레오타이드 서열을 제공하고 있다.

<56> 본 발명에서는 재조합 HBV 게놈을 이용하고 있지만, 본 발명이 HBV에 국한되진 않을 것이다. 혜파드나 바이러스에 속하는 우드척 간염 바이러스(WHV), 얼룩 다람쥐 간염 바이러스(GSHV), 오리 간염 바이러스(DHBV) 등도 서로의 게놈도 유사하므로 본 발명이 다른 혜파드나 바이러스의 유전자 치료용 벡터개발에도 이용될 수 있을 것이다.

<57> 본 발명을 구체화하기 위해 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 완전히 규명한 후 이를 시스-엘리먼트를 보존한 원형(prototype)의 HBV 벡터를 설계하였다. 하지만, 본 발명에서 제시하는 두개의 새로운 시스-엘리먼트(알파 엘

리먼트, 베타 엘리먼트)의 위치를 한정짓지는 않는다. 최대 팩키징 사이즈 (maximal packaging size)이내에서는 야생형 프리게노믹 RNA의 크기인 3.5 kb보다 큰 사이즈의 프리게노믹 RNA 삽입도 가능할 수 있으며, 새로운 시스-엘리먼트는 벡터의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 벡터내의 시스-엘리먼트의 상대적인 위치 변경도 가능 할 수 있다.

<58> 본 발명에서 제공하는 재조합 HBV 게놈의 캡사드화 (encapsidation)를 위해 다음과 같은 과정이 선행되어야 한다. 첫째, 재조합 HBV 벡터는 최소한 한 개 이상의 이종 유전자를 발현한다. 둘째, 헬퍼 플라스미드는 바이러스의 캡시드화와 게놈 복제에 필수적인 코아 단백질, 폴리머라제, 및 표면항원을 트랜스 (in trans)로 제공한다. 즉, 헬퍼 플라스미드와 재조합 HBV 벡터는 간 세포 내에서 서로 상호 보완현상(complementation)으로 캡시드화되어 바이러스 입자(particle)를 형성 할 수 있다. 본 발명이 이용될 수 있는 간세포군주는 다음과 같은 HepG2세포, Huh7세포, Chang 간세포 등의 인간 간 세포 주와 설치류 간 세포주를 포함하는 일련의 간 세포주가 사용될 수 있다.

<59> HBV의 유전자에 이종유전자를 삽입 혹은 치환하여 재조합 HBV의 가능성은 탐색한 연구가 몇가지 문헌에 보고된 바 있다 (Chiang et al., Virology 186:701-711, 1992; Chaisomchit et al., Gene Therapy 4:1330-1340, 1997; Protzer et al., Proc Natl Acad Sci USA 96:10818-10823, 1999). 본 발명은 미국특허 제 5,981,274호와는 몇가지 점에서 차별된다 (Tyrrell et al., US Patent 5,981,274, 1999; Chaisomchit et al., Gene Therapy 4:1330-1340, 1997). 상기 특허는 이종유전자를

HBV 폴라미라제의 스페이서(spacer or tether) 도메인에 삽입시켰다. 무엇보다도 미국 특허 제 5,981,274호에서 사용한 외부유전자 삽입부위는 본 발명에서 규명한 알파-엘리먼트 부위에 해당한다. 즉, 이 알파부위는 HBV 유전자 복제에 필수적이므로 이 부위에 외부유전자의 삽입은 복제를 저해한다. 유전자를 발현하기에는 작은 크기(270 혹은 374 bp)의 절편을 삽입하였으며, 삽입 후 벡터의 복제가 약 50배 감소하였으므로 벡터로 불리기는 어렵다. 이러한 이유로 상기의 미국특허 제 5,981,274호는 유전자 치료용 벡터라고 구분될 수 없다.

<60> 한편, 대만의 Dr. Chang의 연구실에서 약 0.7 Kb 의 발광유전자 (luciferase)를 HBV 유전자의 두 곳에 치환하여 재조합 HBV 입자가 생산됨을 보고된 바 있다 (Chiang et al., Virology 186:701-711, 1992). 또한, 최근에 DHBV와 HBV를 재조합 벡터로 사용한 첫 번째의 성공사례가 보고되었다 (Protzer et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96:10818-10823, 1999). 이 보고에서는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트에 대한 정보없이 녹색형광단백질(GFP) 혹은 인터페론유전자를 HBV 혹은 DHBV 유전자의 여러 곳에 삽입한 결과, 그 중 표면항원 ORF (즉, S ORF)에 이종 유전자를 치환하였을 때 바이러스가 생산됨을 관찰하였다. 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터는 상기 보고와 몇 가지 면에서 차별되는 장점이 있다. 우선, 본 발명은 시스-엘리먼트를 완전히 규명하여 설계한 원형 (prototype)의 HBV 벡터를 제공한다. 즉, 표면항원 ORF를 포함하는 두 군데의 삽입부위를 제공할 뿐 아니라 삽입할 유전자의 최대크기의 한계를 각각 0.79 kb or 1.7 kb임을 구체적으로 제공한다. 즉, 일반적으로 이종유전자를 삽입하여 사용할 수 있는 본격적인 의미의 재조합 유전자 벡터이다.

<61> 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터를 구축하기 위해 사용된 트랜스팩션 기술은 문현과

이 분야의 전문가들이 많이 사용하는 실험재료와 실험방법을 이용하였다.

<62> 본 발명에서 제공하는 HBV 벡터를 만들기 위해 사용하는 접합 (ligation)기술과 제한 (restriction)기술은 문현 (Sambrook et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3rd Ed., N. Y. 2001)에서 기술되어 있는 방법을 사용하였다.

<63> 본 발명에서는 다음과 같은 약어를 사용하였다: DR1 (direct repeat 1), DR2 (direct repeat 2), ϵ (epsilon), GFP (green fluorescence protein), M (molar), mM (millimolar), ml (milliliters), μ g (micrograms), mg (milligrams), K bp (kilo base pairs), PCR (polymerase chain reactin), PEG (polyethylene glycol).

<64> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<65> 단, 다음의 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 다음의 실시예가 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

<66> 실시예 1 : 야생형 HBV발현 벡터(R015; pCMV-HBV/30)의 제조

<67> HBV 유전자 치료벡터를 설계하려면 HBV의 유전자 복제에 필수적인 염기서열부위 (시스-엘리먼트)의 완전한 규명이 선행되어야 한다. 이러한 복제에 필요한 염기서열부위를 규명하기 위하여 세포에 트랜스팩션하였을 때 HBV 유전자 복제능(replication competent)을 갖는 벡터를 제조하였다. 즉, 야생형 HBV를 생성하는 HBV 프리게노믹 RNA 발현 벡터를 제조하였다. 이종 프로모터에 의해 HBV 프리게노믹 (pregenomic) RNA와 동일한 구조 및 염기 서열의 mRNA가 전사되면 HBV의 복제 기작과 동일한 과정을 통해 바이러스 입자를 만들 수 있다는 것은 공지의 사실이다 (Nassal, et al., Cell

63:1357-1363, 1990). 그러므로, HBV를 발현하는 플라스미드를 제조하기 위해 우선적으로 고려해야 할 사항은 바로 전사되는 mRNA가 HBV 프리게노믹 RNA와 동일하도록 만드는 것이다. 이후, 전사된 mRNA로부터 복제에 필요한 바이러스의 단백질이 만들어지고 바이러스 유전자의 복제 및 바이러스 입자가 생산된다. 특히 엡실론 (ϵ)이라는 캡시드화 (encapsidation) 신호는 바이러스의 복제의 첫 단계에서 캡시드화에 필수적인 중요한 인자이다 (Junker-Niepmann et al., EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65: 3309-3316, 1991). 이 엡실론 신호는 프리게노믹 RNA의 5'-말단으로부터 약 30 뉴클레오타이드 (nucleotide) 떨어져 있다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508, 2000).

<68> 본 발명에서 사용한 염기서열 번호는 Galibert 등(Galibert, et al., Nature 28: 646-650, 1979)의 방법에 따라, HBV ayw 서브타입 (subtype)의 염기 서열을 HBV 내의 제한효소 EcoR I 위치를 1번으로 하여 3182번까지 표기한 것이다. 표시된 염기서열번호는 HBV의 것이며, 만약 다른 것의 염기서열번호를 사용시는 따로 표시해 주었다. 프리게노믹 RNA의 5'쪽 말단부위는 1820 서열번호로 표시하였으며, 전사시작 자리를 의미한다. R015 플라스미드의 염기서열은 서열목록3에 표시되어 있다.

<69> 1-1. R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)의 제조

<70> HBV 유전자는 HBV ayw subtype의 유전자를 갖는 pSV2A-Neo(HBV)2 플라스미드를 이용하였다 (Shih et al., Proc Natl Acad Sci USA. 86(16):6323-71989, 1989).

우선, HBV의 프리게노믹 RNA의 5'-말단과 3'-말단이 동일한 염기서열 및 구조(terminal redundancy)를 가지기 때문에 선상(linear)의 플라스미드 전사에서 이를 보전하기 프로모터의 하부(downstream)에 게놈크기보다 큰 게놈을 삽입하였다. 그러므로, CMV 프로모터로부터 숙주세포의 RNA 폴리머라제 (polymerase) II에 의해 전사가 일어나는 pcDNA1/Amp (Invitrogen, USA)의 클로닝 사이트에 있는 *EcoR* V와 *Xba* I의 제한효소 인식 부위 사이에 HBV 전체 유전자보다 172 뉴클레오타이드가 더 겹치는 길이의 HBV ayw 서브타입(subtype) 유전자를 *Fsp* I과 *Xba* I으로 잘라서 삽입하였다 (도면 5a참조). 이로써 만들어진 R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)는 야생형 HBV와는 달리 5'-말단으로부터 엡실론 신호가 164 뉴클레오타이드 떨어져 있는 mRNA로 전사된다. 이는 야생형에 비하여 엡실론의 위치가 5'-말단으로부터 134 뉴클레오타이드가 더 멀리 떨어진 것이다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508, 2000). 이러한 결과는 pcDNA1/Amp의 전사가 시작되는 지점이 삽입부위보다 상부(upstream)에 위치하기 때문이다.

- <71> 1-2. 야생형 HBV 프리게노믹 RNA를 발현하는 R015 플라스미드(pCMV-HBV/30) 제조
<72> 야생형 HBV 프리게노믹 RNA와 같은 염기 서열 및 구조를 지닌 mRNA를 전사하도록 만들기 위해 실사예 1-1에서 만든 플라스미드의 5'-말단 염기를 제거하였다. 도면 5a에서와 같이 R402 플라스미드(pCMV-HBV/164)를 *Sac* I과 *Bsp*E I으로 자르고, 동일한 제한효소 인식 부위를 양끝에 보유한 HBV유전자 절편을 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭하였다 (Jeong et al., J. Virol. 74:5502-5508, 2000). 이때 인위적인 제한 효소 인식 부위를 삽입하고 R402 플라스미드의 전사 시작 부위에 HBV 프리게노믹 RNA 시작 부위가 정확하게 일치하도록 프라이머(HBV1820)를 제작하였다. 사용한 프라이머 염기 서열은 다음과 같다.

<73> HBV1820 ;

<74> 5-CCCGAGCTCTGGCTAACTAACTTTCACCTCTGCC-3

<75> *Sac* I HBV 염기 서열(nt 1820-1837)

<76> HBV2839-2822 ;

<77> 5-CCCAAGCTTCTATTGTTCCAAGAATATGG-3

<78> 이들 프라이머와 R402 플라스미드를 주형(template)으로 하여 만들어진 PCR 산물을 다시 *Sac* I (nt 2894 of pcDNA1/amp)과 *Bsp*E I(nt. 2331)으로 잘라서 플라스미드 R402에 삽입하였다.

<79> 1-3. 헬퍼 플라스미드 R063 (pCMV- CPS) 플라스미드의 제조

<80> pcDNA3 (Invitrogen, USA)의 EcoR I, Xho I 인식부위에 R015 플라스미드를 주형으로 하여 만든 PCR 생성물(nt. 1903-to-2454)을 삽입하였다. 자세히 설명하면, 정방향 프라이머(forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 EcoR I 인식부위를 만들고 역방향 프라이머(reverse primer)의 5' 쪽 말단 부위에 Xho I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 0.5 K bp의 EcoR I, Xho I 절편을 pcDNA3 플라스미드의 EcoR I, Xho I 인식부위에 삽입하여 R062 플라스미드를 만들었다. 그 다음, R015 플라스미드의 *Bsp*E I (nt. 2331), *Apa* I 사이의 약 2.6 K bp의 절편을 R062 플라스미드의 *Bsp*E I, *Apa* I 절편과 치환하여 R063 플라스미드를 만들었다. R063 플라스미드는 코아, 폴리머라제, 표면항원을 발현하는 헬퍼 플라스미드로 사용되었다.

<81> Forward primer: 5'-CATGGAATTCATGGACATCGACCCT-3'

<82> (*Eco*R I site underlined)

<83> Reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAGA-3'

<84> (Xho I site underlined)

<85> 실시예 2 : R015 플라스미드(pCMV-HBV/30)에서 전사되는 프리게노믹 RNA의 복제능

<86> 2-1. 간암세포주의 세포성장과 트랜스팩션

<87> 간암 세포주인 Huh7 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)과 10mg/ml gentamycin을 넣은 DMEM (Gibco-BRL) 배지에 3일마다 분주하여 세포를 키웠다. 트랜스팩션하기 하루 전에 Huh7 세포를 75 %로 60mm 플레이트에 배양시켜 세포를 준비한다. 먼저 인산완충용액 (phosphate buffered saline)으로 세포를 두 번 씻고 새 배양액으로 갈아준 다음, 상기 플라스미드 10 μ g을 0.25 M CaCl₂가 포함된 250 ml의 물에 섞은 다음, 동량의 2X HEPES 완충용액 [280 mM NaCl, 50 mM HEPES acid, 1.5 mM Na₂HPO₄ (pH 7.1)]에 흔들면서 한 방울 씩 떨어뜨려 혼합물을 만든다. 이후 이 혼합물을 상온에서 30분간 반응시켜 하얀 침전물이 생기도록 한 다음 플레이트에 골고루 뿌려준다. 트랜스팩션 16시간 후 새로운 배양액 [DMEM, 10% FBS, 10 mg/ml gentamycin]으로 갈아주고, 3일 후 바이러스 코아 입자를 추출하였다.

<88> 2-2. 코아입자로부터 HBV DNA 추출 및 써던 블렛을 통한 HBV replication-intermediate DNA의 조사

<89> 트랜스팩션 3일 후, PEG 침전법으로 세포내 코아입자를 추출하여 HBV의 DNA를 준비하였다 (Staprans et al., J. Virol. 65:1255-62, 1991). 자세히 설명하면, 먼저 인산완

충용액 (phosphate buffered saline)으로 세포를 두 번 씻고 세포용액 완충용액 [10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 8 % sucrose, 0.25 % Nonidet P-40]로 세포를 플레이트로부터 떼어낸다. 남아있는 트랜스팩션한 플라스미드를 제거하기 위해 6 mM MgCl₂와 DNase I (50 μg/ml) 처리를 37 °C 30분간 처리한 후, 4 X PNE [26 % PEG, 1.4 M NaCl, 40 mM EDTA]로 코아입자를 침전시키고 원심분리를 하여 코아 입자만을 분리해내었다. 수득한 코아 입자 단백질을 분해하기 위해 프로네이즈(pronase, Sigma, USA)로 37 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 페놀과 클로로포름(1:1)으로 단백질을 제거하고 에탄올로 코아 입자를 침전시킨 후, TE [10 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA]로 DNA를 추출하였다.

<90> 추출된 바이러스 DNA를 1.25 % 아가로스겔을 통해 전기 영동하고, 문헌(*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. et al., eds., Wiley and Sons, New York, 1995)에서 기술된 써던 블렛 방법으로 분석하였다.

<91> 실시예 3 : R015 플라스미드(pCMV-HBV/30)의 결손 변이체의 제조

<92> 일반적인 유전자 재조합 기술을 이용하여 다음과 같은 결손 변이체를 만들었다.

<93> 3-1. R060(pCMV- ayw ↳ 1910-1992) 플라스미드의 제조:

<94> HBV 유전자 (Galibert et al., Nature 28: 646-650, 1979)의 *Sac* I, *Eco*R I 사이의 절편을 pBluescript SK(+) 플라스미드 (Stratagene, USA)의 *Sac* I, *Eco*R I 자리로 옮긴 후 PCR로 nt. 1910-1992 가 소거된 R059 플라스미드(pBS+ ↳ 1910-1992)를 제조하였다. R059 플라스미드의

Sac I, *EcoR* I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R060 플라스미드를 만들었다.

<95> 3-2. R048(pCMV- ayw 1884-2459) 플라스미드의 제조

<96> HBV유전자의 *Sac* I, *EcoR* I(nt. 3182) 사이의 절편을 pCH110 (Pharmacia)의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R046 플라스미드를 만든 후, 151 bp의 *Xba* I 절편(1992-2143)을 소거시킨 R047 플라스미드를 제조하였다. R047 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R048 플라스미드를 만들었다.

<97> 3-3. R056(pCMV- ayw 2143-2459) 플라스미드의 제조

<98> R015 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 사이의 절편을 pBluescript II SK(+) (Stratagen, USA.)의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R049 플라스미드를 만들었다. R049 플라스미드의 *Sty* I(nt. 1884)-*Sty* I(nt. 2459) 절편을 역방향 프라이머(reverse primer)의 5' 쪽 말단 부위에 *Sty* I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 *Sty* I(nt. 1884)-*Xba* I(nt. 2143) 절편으로 치환시켜 R051 플라스미드를 만들었다. R051 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 *Sac* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R056 플라스미드를 만들었다.

<99> Forward primer: 5' CCCGAGCTCTGGCTAACTTTCACCTCTGCC-3' (*Sac* I site underlined)

<100> Reverse primer: 5'-CCCCCAAGGCCGCTGGATCTTCAAATT-3'

<101> (*Sty* I site underlined)

<102> 3-4. R021(pCMV-ayw 2459-2817) 플라스미드의 제조

- <103> R015 플라스마드의 *Sac* I, *Xba* I (nt. 129) 사이의 절편을 pBlueBacHis2 플라스마드 (Invitrogen, USA.)의 *Sac* I, *Xba* I 자리로 옮겨 R407 플라스미드를 만들었다. R407 플라스미드의 *Sty* I(nt. 2459), *BstE* II(nt. 2817) 사이를 잘라서 클레노우 절편 (Klenow fragment)으로 채우고 (filling-in), 라이게이션(ligation)하여 nt. 2459-2817 을 소거시킨 R018 플라스미드를 만들었다. R018 플라스미드로부터 *BspE* I, *EcoR* I 사이의 절편을 R015의 *BspE* I, *EcoR* I 자리로 옮겨 R021 플라스미드를 만들었다.
- <104> 3-5. R022(pCMV-ayw Δ2662-3182/0) 플라스미드의 제조
- <105> R015 플라스미드를 *BstE* II(nt. 2662)와 *EcoR* I(nt. 3182)으로 잘라서 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 2662-3182를 소거시킨 R022 플라스미드를 만들었다.
- <106> 3-6. R045(pCMV-ayw Δ2839-3182/0) 플라스미드의 제조
- <107> 먼저, R015 플라스미드를 *BstE* II(nt. 2817)과 *Sph* I(nt. 1239)로 자른 뒤 pGEM-4Z (Promega, USA)로 옮겨 R701 플라스미드를 만들었다. R701 플라스미드의 *Bgl* II(nt. 2839)와 *EcoR* I(nt. 3182) 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 2839-3182을 소거시킨 R043 플라스미드를 만든 다음, R043 플라스미드를 *BstX* I으로 자른 절편을 R015 플라스미드의 *BstX* I(nt. 2817-620) 사이의 절편으로 치환하여 R045 플라스미드를 만들었다.
- <108> 3-7. R044(pCMV-ayw Δ3052-3182/0) 플라스미드의 제조
- <109> R701 플라스미드의 *Bsu*36 I(nt. 3052)과 *EcoR* I(nt. 3182) 사이의 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 3052-3182을 소거시킨 R042 플라스미

드를 만든 다음, R042 플라스미드를 *Bst*X I으로 자른 절편을 R015 플라스미드의 *Bst*X I(nt. 2817-620) 사이의 절편과 치환시켜 R044 플라스미드를 만들었다.

<110> 3-8. R023(pCMV-ayw Δ3182/0-129) 플라스미드의 제조

<111> R015 플라스마드를 *Eco*R I(nt. 3182)과 *Xho* I(nt. 129)으로 자르고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션하여 nt. 3182/0-129를 소거시킨 R023 플라스미드를 만들었다.

<112> 3-9. R040(pCMV-ayw Δ129-490) 플라스미드의 제조

<113> R018 플라스마드의 *Eco*R I(nt. 3182), *Sph* I(nt. 1239) 사이의 절편을 pGEM-4Z(Promega, USA) 플라스미드에 삽입하여 R037 플라스미드를 만들었다. R037 플라스미드를 *Xho* I(nt. 129), *Bam*H I(nt. 490)으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 129-490을 소거한 R038 플라스미드를 만들었다. R038 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 사이의 877 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로 옮겨 R040 플라스미드를 만들었다.

<114> 3-10. R041(pCMV-ayw Δ490-827) 플라스미드의 제조

<115> R037 플라스미드를 *Bam*H I(nt. 490)과 *Acc* I(nt. 827)으로 자른 후 클레노우 절편으로 채우고 라이게이션하여 nt. 490-827을 소거한 R039 플라스미드를 만들었다. R039 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 사이의 897 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 *Eco*R I, *Sph* I 자리로 옮겨 R041 플라스미드를 만들었다.

<116> 3-11. R025(pCMV-ayw Δ827-1238) 플라스미드의 제조

<117> R015 플라스미드의 *Eco*R I(nt. 3182)과 *Apa* I 사이의 절편을 pBluescript II

SK(+) (Stratagene, USA.)로 옮겨 R050 플라스미드를 만들었다. R050 플라스미드의 Acc I(nt. 827)과 Sph I(nt. 1238)사이의 절편을 소거하고 T4 DNA 폴리머라제로 채우고 라이게이션하여 nt. 827-1238을 소거한 R008 플라스마드를 만들었다. R008 플라스미드의 R I, Apa I 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R025 플라스미드를 만들었다.

<118> 3-12. R026(pCMV-ayw Δ1238-1374) 플라스미드의 제조

<119> R050 플라스미드를 Sph I(nt. 1238), Nco I(nt. 1374)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채우고 라이게이션하여 nt. 1238-1374를 소거한 R009 플라스미드를 만들었다. 다음, R009 플라스미드의 EcoR I과 Apa I 사이의 1866 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 치환시켜 R026 플라스미드를 만들었다.

<120> 3-13. R027(pCMV-ayw Δ1374-1419) 플라스미드의 제조

<121> R050 플라스미드를 Nco I(nt. 1374), Aat II(nt. 1419)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 라이게이션하여 nt. 1374-1419를 소거한 R012 플라스미드를 만들었다. 다음, R012 플라스미드의 EcoR I(nt. 3182), Apa I 사이의 1957 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R027 플라스미드를 만들었다.

<122> 3-14. R028(pCMV-ayw Δ1419-1804) 플라스미드의 제조

<123> R050 플라스미드를 Aat II(nt. 1419), Fsp I(nt. 1804)로 자른 후 T4 DNA 폴리머라제로 채운 후 라이게이션하여 nt. 1419-1804가 소거된 R013 플라스미드를 만들었다. R013 플라스미드의 EcoR I(nt. 3182), Apa I 사이의 1617 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R028 플라스미드를 만들었다.

- <124> 3-15. R053(pCMV-ayw Δ1419-1804) 플라스미드의 제조
- <125> R050 플라스미드의 Aat II(nt. 1419)과 Apa I 사이의 절편을 앞방향 프라이머 (forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 Aat II 인식부위를 만든 PCR 생성물인 Aat II(nt. 1592)-Apa I 절편으로 치환시켜 R052 플라스미드를 만들었다. 다음, R052 플라스미드의 EcoR I, Apa I 사이의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R053 플라스미드를 만들었다.
- <126> 3-16. R035(pCMV- ayw Δ1607-1804) 플라스미드의 제조
- <127> R050 플라스미드를 EcoR I(nt. 3182)-Bsa I(nt. 1607) 사이의 블런트(blunt) 절편을 만든 후, R015 플라스미드를 EcoR I(nt. 3182)-Fsp I(nt. 1804) 사이의 절편과 치환시켜 R035 플라스미드를 만들었다.
- <128> 3-17. R029(pCMV- ayw Δ1804-1884) 플라스미드의 제조
- <129> R050 플라스미드의 Fsp I(nt. 1804)-Sty I(nt. 1884)사이의 절편을 소거하고 클레노우 절편으로 채운 후 라이게이션 하여 nt. 1804-1884를 소거한 R010 플라스미드를 만들었다. 다음, R010 플라스미드의 EcoR I(nt. 3182), Apa I 사이의 1922 bp 크기의 절편을 R015 플라스미드의 EcoR I, Apa I 자리로 옮겨 R029 플라스미드를 만들었다.
- <130> 실시예 4: HBV 게놈 복제에 필수적인 시스-엘리먼트의 분석
- <131> 4-1. 코아 입자로부터 HBV DNA 추출 및 써던 블럿
- <132> 트랜스팩션, DNA 추출과 써던 블럿을 실시예 2-2와 동일하게 실시하였다. HBV 유전자 복제에 필요한 바이러스의 단백질을 제공하기 위해, 코아 단백질과 폴리머라제를

제공할 수 있는 헬퍼 플라스미드(R063, pCMV-CPS)를 함께 트랜스팩션 하였다. 도면 7에서 17종의 결손 변이체들의 써던 블럿 결과를 보여주고 있다. HBV 유전자 복제 기전에서 설명하였듯이 코아입자에 존재하는 HBV 유전자 복제의 중간체는 SS(단일-가닥 DNA), DL(이중-가닥 DNA), RC(relaxed circular DNA, 릴렉스드 환형) 형태로 존재한다. 이중에서 RC(릴렉스드 환형)형태의 DNA가 바이러스 입자 (virion particle)에 존재하는 HBV 게놈 복제의 최종 산물이므로 RC 형태 DNA의 존재여부로 각 결손 변이체에 결손된 염기 서열이 복제에 필요한 시스-엘리먼트 인지 판단할 수 있다.

<133> 4-2. 시스-엘리먼트 분석

<134> HBV복제에 필요한 시스- 엘리먼트를 규명하고자 제한효소 자리를 이용하여 여러 개의 결손 변이체를 제조하였다. 이를 결손 변이체는 각각 약 0.1-0.4 K bp의 조각의 소거로 모두 합하면 HBV 전체 게놈을 포함한다.

<135> 써던 블럿 결과를 분석해보면, R022 플라스미드 (pCMV-aywΔ2662-3182/0)를 트랜스팩션 한 경우 RC DNA는 검출되지 않았고 SS DNA만이 검출되었다 (도면 7, 표1). 이 부위를 좀더 세분하게 규명하기 위하여 R022 플라스미드를 R045 플라스미드 (pCMV-aywΔ2839-3182/0)과 R044 플라스미드 (pCMV- ayw Δ3052-3182/0)로 구분한 뒤 써던 블럿을 수행하였다. 그 결과, R044 플라스미드는 SS DNA, DL DNA 뿐 아니라 RC DNA가 검출되었으므로 R044의 결손부위는 복제에 불필요함을 알 수 있었다 (도면 7, 표1). 반면에, R045 플라스미드는 적은 양의 SS DNA만이 검출되었으므로 R045 플라스미드의 결손 부위 (nt. 2839-3182/0)가 복제에 필요한 부위를 포함하고 있음을 알 수 있었다 (도면 7, 표1). 한편, R021 플라스미드 (pCMV- ayw Δ2459-2817)은 SS DNA, DL DNA 뿐 아니라 RC DNA가 검출되었으므로 R021의 결손부위는 복제에 불필요하다 (도면 7, 표1). 상기 네

가지 결손 변이체의 결과로부터 (nt. 2818-3052)가 새로운 시스- 엘리먼트임을 알 수 있었다. 본 발명에서 이 부위를 알파-엘리먼트(α)로 명명하였다.

<136> R028 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1419-1804)은 DR2(nt. 1592-1602)가 결손되어 있는 변이체이다. R028 플라스미드의 써던 블렛 결과를 보면 RC (relaxed circular) DNA가 나타나지 않고, 단일 가닥 DNA만이 감지되었다 (도면 7, 표1). 이 결과로 DHBV에서 마이너스-가닥 DNA 합성에 DR2가 중요한 역할을 한다는 보고와 일치한다 (Loeb et al., J. Virol. 70: 8684-8690, 1996; Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992). 이를 확인하고자 DR2 부분 앞까지만 소거한 R053 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1419-1592)를 만들어 써던 블렛을 실시한 결과, RC DNA를 확인하였다 (도면 7, 표1). 그러므로, R028 플라스미드는 새로운 시스-엘리먼트를 포함한 것이 아니라 DR2 엘리먼트 (nt. 1592-1602)가 결손되어 있어 RC (relaxed circular) DNA가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

<137> 한편, R035 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1607-1804)는 DR1과 DR2 사이가 결손된 변이체로 DNA 합성이 전혀 일어나지 않았다 (도면 7, 표1). 마이너스-가닥 DNA 합성의 개시부위(initiation 자리)인 DR1이 존재하지만, 복제가 일어나지 않으므로 DR1과 DR2 사이의 염기서열은 복제에 필요함을 알 수 있었다. 즉, 이 부분은 마이너스-가닥 DNA 합성에 필요하다. 이 부분은 새로운 시스-엘리먼트이므로 베타-엘리먼트(β)로 명명하였다.

<138> R029 플라스미드 (pCMV- ayw Δ 1804-1884)는 DR1(nt. 1826-1836)이 결손된 변이체로서 마이너스-가닥 DNA 합성이 전혀 감지되지 않았다 (도면 7, 표1). 이것은 문현의 보고와 일치된 결과를 보여주고 있다 (Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992).

<139> 결론적으로, 본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 두개의 새로운 시스- 엘리먼

트들을 규명하였다. 이러한 썬던 블렛의 결과로 인해 HBV 복제기전에서 중요한 시스-엘리먼트에 대한 종합적인 이해로 원형(prototype)의 HBV 벡터를 설계할 수 있었다.

<140> 한편, HBV 유전자의 일부는 HBV 유전자 복제에 불필요한 결손가능부위(dispensable region)로 밝혀졌다. 결손되어도 RC(relaxed circular) DNA를 형성할 수 있는 것으로 나타난 결손 변이체들은 R060 (pCMV- ayw ⌂1910-1992), R048 (pCMV- ayw ⌂1992-2143), R056 (pCMV- ayw ⌂2143-2459), R021 (pCMV- ayw ⌂2459-2817), R044 (pCMV- ayw ⌂3052-3182/0), R023 (pCMV- ayw ⌂3182/0-129), R040 (pCMV- ayw ⌂129-490), R041 (pCMV- ayw ⌂490-827), R025 (pCMV- ayw ⌂827-1238), R026 (pCMV- ayw ⌂1238-1374), R027 (pCMV- ayw ⌂1374-1419), R053 (pCMV- ayw ⌂1419-1592)을 포함한다.

<141> [표 1] 결손 변이체의 결손위치에 따른 복제 여부를 요약한 표

<142>

표 1. HBV 결손변이체의 유전자 복제능의 결과 요약

결손변이체	결손 위치	결손 크기 (bp)	유전자 복제능
R060	1910-1992	81	+++
R048	1992-2143	151	+++
R056	2143-2459	316	+++
R021	2459-2817	358	+++
R022	2662-3182/0	520	-
R045	2839-3182/0	343	-
R044	3052-3182/0	136	++
R023	3182/0-129	129	++
R040	129-490	361	+
R041	490-827	347	+
R025	827-1238	411	+++
R026	1238-1374	136	+++
R027	1374-1419	45	++
R028	1419-1804	385	-
R053	1419-1592	173	+++
R035	1607-1804	197	-
R029	1804-1884	80	-

<143>

실시예 5: 원형(prototype) HBV 유전자 치료 백터 설계

<144>

본 발명에서는 HBV 유전자 복제에 필요한 새로운 시스-엘리먼트들을 모두 규명하였

다. 문헌상에서는 HBV 계놈 복제 단계에 중요한 엘리먼트가 몇가지 이미 밝혀져 있다.

이 엘리먼트들은 캡시드화의 신호로 쓰이는 5' 쪽 엡실론 (Junker-Niepmann et al.,

EMBO J. 9:3389-3396, 1990; Hirsch et al., J. Virol. 65: 3309-3316, 1991), DR1과 DR2 엘리먼트 (Condreay et al., Virology 188:208-216, 1992; Seeger et al., J. Virol. 65:5190-5195, 1991; Nassal et al., J. Virol. 70:2764-2773, 1996), 원형화 (circularization)에 작용하는 r (repeat) 엘리먼트 (Loeb et al., J. Virol. 71: 152-160, 1997), post-transcriptional RNA processing에 필요한 PRE 엘리먼트 (Huang et al., Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3869, 1995; Yen et al., Virology. 1998 248:46-52, 1998) 등이 있다. 이밖에, 본 발명에서는 전체 HBV 계놈의 맵핑(mapping)을 통해 두 가지의 새로운 시스-엘리먼트를 규명하였다.

<145> HBV 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트들을 규명함으로써 원형 (prototype)의 HBV 유전자 치료 벡터를 설계할 수 있는 초석을 마련했다 (도 8 참고). HBV 유전자 치료 벡터 개발에 있어 가장 고려해야 할 점은 이종유전자의 삽입 위치와 이종유전자의 크기일 것이다. 본 발명에서는 원형 (prototype)의 HBV 유전자 치료 벡터를 개발하기 위해 2개의 이종 유전자의 삽입 가능부위를 선정하였다. 먼저, 5' 쪽 엡실론 (ϵ)과 알파 (α)-엘리먼트 (nt. 1909-2817) 사이에 HBV 유전자를 이종 유전자의 치환이 가능할 것이다. 이 삽입부위에 적어도 0.9 K bp 크기의 이종유전자 DNA 절편의 삽입이 가능할 것이다. 더군다나, 이 삽입부위의 상부 (upstream)에 위치하여 코아 프로모터 (core promoter)를 삽입된 이종유전자 발현에 활용하게된다. 두 번째로, 알파(α)-엘리먼트와 DR2 엘리먼트 사이를 이종유전자로 치환시킬 수 있다. 여기서는 1.7 K bp 크기의 DNA 절편을 이종유전자로 치환시킬 수 있다. 첫 삽입부위와 유사하게, 두 번째 삽입 부위의 상부에 프리(pre)-S2/S 프로모터 (promoter)가 위치하고있다. 그러므로, 이 부위에 삽입한 이종유전자는 프리(pre)-S2/S 프로모터 (promoter)를 이용하여 발현할 수 있다.

<146> 실시예 6: 이종유전자가 삽입된 HBV vector의 제조

<147> 실시예 5에서 설계된 HBV 벡터의 결손가능부위에 외부 유전자를 삽입하여 그 복제를 조사하기 위해 이종유전자인 녹색형광단백질 (GFP, green fluorescent protein) 유전자를 삽입시킨 R711 플라스미드 (pCMV-HBV/GFP)를 제조하였다. (도면 9 참고)

<148> 6-1. 삽입 부위와 프로모터 (promoter)

<149> 다음과 같은 사항을 고려하여 삽입 부위를 결정하였다. 첫째, HBV 게놈 복제에 필수적인 모든 시스-엘리먼트는 존재하여야 한다. 둘째, 최대 팩키징될 수 있는 크기 (packaging limit)를 넘지 않는 범위에서 발현 능력을 가진 내재 바이러스 프로모터가 필요하다.

<150> 6-2. 녹색형광단백질(GFP) 유전자의 HBV벡터로의 삽입

<151> 외부 유전자가 삽입된 재조합 HBV 벡터를 제조하기 위해 약 0.7 K bp의 녹색형광단백질 (GFP) 유전자를 HBV 벡터에 삽입하였다. 우선, 녹색형광단백질 (GFP) 유전자를 PCR 생성물로 만든 다음, 이 때 GFP PCR 산물의 양끝에는 프라이머를 통해 만들어진 제한효소 인식 부위가 생성되도록 제작하였다. 먼저, R709 플라스미드 (pCMV-HBV/ Δ P_{S2}-GFP)는 R015 플라스미드의 Bsu36 I(nt. 3052)-EcoR I(nt. 3182)사이의 절편을 양쪽 끝에 Bsu36 I-EcoR I 제한효소 인식부위를 가진 0.7 K bp 크기의 GFP 유전자를 발현하는 PCR 생성물로 치환시켜 만들었다. 구체적으로, 프라이머 GFP BsuFII의 5' 말단으로부터 클로닝을 위한 Bsu36I의 제한효소 인식부위를, 그리고 프라이머 GFPEcoRII의 5' 말단에 EcoRI의 제한효소 인식부위를 넣어서 PCR에 이용하였다.

<152> 구체적인 염기 서열은 다음과 같다.

<153> GFP*Bsu*FII ;

<154> 5-GTCACTCCTCAGGCCATGAGTAAAGGAGAAG -3

<155> *Bsu* 36I

<156> GFPEcoRII ;

<157> 5-GGAATTCCTTATTGTATAGTTCATCA -3

<158> *EcoR* I

<159> 일련의 클로닝과정 중에서 프리(pre)-S2/S 프로모터(promoter)의 일부가 결손된다.

결손된 pre-S2/S 프로모터 부위를 복구하기 위해, *Bsu*36 I(nt. 3052)-*Bsu*36 I(nt. 3166) 사이의 절편을 R709 플라스미드에 삽입하여 R710 플라스미드 (pCMV-preHBV/GFP)를 만들었다. 그 다음, R711 플라스미드(pCMV-HBV/GFP)를 만들기 위해 R710 플라스미드의 *EcoR* I(nt. 3182)-*Sph* I(nt. 1238)사이의 절편을 소거하였다. 결국, 1.3 K bp 크기의 HBV 유전자 일부가 0.7 K bp의 GFP 유전자로 치환된다. 그러므로, 벡터는 전체 계놈 크기가 1.3 K bp 정도가 소거되고 GFP 유전자인 0.7 K bp가 첨가되어 HBV 계놈 크기보다 0.6 K bp가 작아지게 만들었다.

<160> 실시예 7: 재조합 HBV 유전자 벡터의 복제 확인

<161> 재조합 HBV 벡터의 복제 능력을 확인함으로써 유전자 치료 벡터로서의 유용성을 확인하였다. R711 플라스미드와 pCMV-CPS(헬퍼, Helper)를 Huh7 세포에 트랜스팩션 하였

다. 실시예 2-2와 같이 코아 DNA를 추출하고, HBV 프로브(probe)를 이용한 써던 블럿하였다 (도면 11a). 대조군(control)으로 HBV를 생산하는 간암세포주인 HepG2.2.15 세포에의 코아입자에서 추출한 DNA를 비교 분석하였다 (Sellis et al., J Virol. 62:2836-44, 1988). 도면 11a에서와 같이 양성대조군인 HepG2.2.15 세포와 R015 플라스미드가 트랜스팩션된 세포에서 RC(relaxed circular) DNA, DL(double-stranded linear) DNA, SS (single-stranded) DNA 등이 검출되었다. 더군다나, R711 플라스미드를 트랜스팩션시켰을 때의 경우에도, RC DNA가 보이는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이, RC DNA의 양이 야생형 HBV 클론인 R015 플라스미드를 트랜스팩션한 경우와 비슷하다는 것도 확인할 수 있었다. 또한, 도면 11b에서 GFP 프로브(probe)를 이용한 써던 블럿 결과에서 R711 플라스미드 벡터의 복제능력을 재확인할 수 있었다. 결론적으로, 본 발명이 제공하는 원형의 HBV 벡터는 이종 유전자를 삽입하여도 복제능 (replication competent)에 손상이 없으므로 유용한 유전자 치료 벡터로의 가능성이 입증되었다.

<162> 플라스미드 R711 (pCMV-HBV/GFP)는 HBV 게놈의 크기가 야생형과 비교하여 0.6 K bp 작다. HBV 게놈의 크기가 마이너스-가닥의 이동(translocation)에 영향을 줄 수 있으므로 (HO et al., 2000). 이를 보완하기 위해 야생형의 게놈크기와 동일한 R712 (pCMV-HBV/GFP3.2) 플라스미드를 제작하였다. R712 플라스미드는 R710 플라스미드의 EcoR I(nt.3182)-Apa I 절편을 소거하고, PCR을 이용하여 앞방향 프라이머(forward primer)의 5' 쪽 말단 부위에 EcoR I 인식부위를 만든 PCR 생성물인 EcoR I(nt. 732)-Apa I 절편으로 치환시켜 R712 플라스미드를 만들었다. 프라이머의 구체적인 염기 서열은 다음과 같다.

<163> EcoRI732F;

<164> 5-GGAATTCTTCAGTTATATGGAT -3

<165> EcoR I

<166> HBVECTOR-R2;

<167> 5-TAGAATAGGGCCTCTAGAA -3

<168> Apa I

<169> R712 플라스미드는 소거된 HBV크기만큼 이종유전자가 들어가 있으므로 전체 크기가 야생형과 동일하다. R712 플라스미드를 트랜스펙션시켰을 때의 경우, R711과 마찬가지로 써던 블렛 결과에서 RC DNA를 확인할 수 있었다.

<170> R711과 R712의 서열정보는 서열목록 4와 5에 각각 나타내었다.

【발명의 효과】

<171> 상기한 구성의 본 발명에 따르면, 본 발명에서 제공하는 재조합 바이러스는 간세포에만 선택적으로 감염하여 치료용 유전자를 전달하는 특성이 있으므로 *in vivo* 치료와 *ex vivo* 치료가 가능한 장점이 있으며, 이러한 새로운 유전자 치료용 재조합 B형 간염 바이러스 벡터는 간 조직에 DNA를 직접 삽입, 순환 등의 방법으로 주입 (administration)시키면 간으로 이종 유전자를 전달하고 발현시키는데 직접 이용이 가능하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

HBV 계놈 복제에 필수적인 새로운 두 가지의 시스-엘리먼트인 서열목록 1에 기재된 알파-엘리먼트 및 서열목록 2에 기재된 베타-엘리먼트 서열을 포함하는 원형 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기의 벡터는 5' 쪽에서부터 3' 쪽까지의 사이토메갈로 바이러스의 초기프로모터, DR1 엘리먼트, 엡실론 엘리먼트, 제 1항의 알파-엘리먼트, DR2 엘리먼트, 제 1항의 베타-엘리먼트, DR1 엘리먼트를 포함하는 서열목록 3에 기재된 원형 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서,

상기의 엡실론과 상기의 알파-엘리먼트 사이에 외래 유전자 삽입 부위를 갖는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 4】

제 2 항에 있어서,

상기의 알파-엘리먼트와 상기의 DR2 사이에 외래 유전자 삽입 부위를 갖는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 5】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터를 사용하는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 6】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 HBV 유전자 중 내부바이러스 프로모터 중에서 코아 프로모터와 프리 S2/S 프로모터를 각각 선택하여 사용하는 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 7】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 상기의 엡실론 엘리먼트와 상기의 알파 엘리먼트 사이에 0.90 K bp까지 삽입할 수 있는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 8】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 야생형 3.2 K bp HBV 게놈의 크기를 증가시키지 않고 상기의 알파 엘리먼트와 상기의 DR2 엘리먼트 사이에 1.7 K bp까지 삽입할 수 있는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 9】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 복제에 필수적인 코아 단백질 혹은 폴리머라제 유전자가 결손된 복제불능인 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 10】

제 2 항에 있어서,

상기의 벡터는 적어도 한 개의 이종유전자를 발현할 수 있는 이종 염기서열을 포함하는 유전자 치료용 B형 간염 바이러스 플라스미드 벡터.

【청구항 11】

B형 간염바이러스의 캡시드화에 필수적인 앱실론 엘리먼트가 결손되어 복제할 수 없지만 B형 간염바이러스의 단백질을 발현하여, 재조합 HBV 벡터에 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질을 발현하는 헬퍼 플라스미드

【청구항 12】

제 10 항의 재조합 HBV 벡터와 제 11항의 헬퍼 플라스미드를 간 세포주에 함께 트랜스팩션하여 재조합 HBV 입자 제조 방법:

상기에서 제10항의 재조합 HBV 벡터는 바이러스 유전자 복제에 필수적인 시스-엘리먼트를 포함하며, 적어도 한 개의 유전자 치료용 이종유전자를 발현할 수 있으며, 또한 바이러스 유전자 복제에 필요한 바이러스 유전자 중 적어도 한가지를 발현할 수 있으며, 제 11항의 헬퍼 플라스미드는 바이러스 유전자 복제에 필요한 단백질 중 적어도 한가지를 발현할 수 없는 재조합 HBV 벡터에게 이 결핍된 단백질을 제공하여 재조합 HBV 벡터를 보완하여 감염성있는 바이러스를 생산할 수 있어야 하고, 상기의 간 세포주는 복제에 필요한 단백질이 제공되면 재조합 HBV 벡터가 복제할 수 있는 간 세포주이다.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서,

상기의 간세포는 인간의 간세포, 조류의 간세포, 설치류의 간세포의 집단으로부터 선택된 간세포인 것을 특징으로 하는 재조합 HBV 입자 제조 방법.

【청구항 14】

제 12 항의 재조합 HBV 입자를 혈관 내 또는 간 조직 내 투여 방법으로 표적세포에 감염 방법.

【청구항 15】

제 14 항에 있어서,

상기의 표적세포의 집단은 인간의 간세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【청구항 16】

제 14 항에 있어서,

상기의 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스 유전자와 라이보자임을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스 유전자와 라이보자임을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 유전자, 성장 인자, 호르몬, 사이토카인, 세포막 수용체, 혈액 응고 인자로 구성된 이종 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【청구항 17】

HBV에 만성 감염된 환자의 간 조직내로 직접 외래 유전자가 삽입된 재조합 HBV 벡터 DNA의 주입방법을 포함하는 재조합 HBV 입자를 표적세포에 감염 방법.

【청구항 18】

제 17 항에 있어서,

상기의 표적세포의 집단은 인간의 간세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

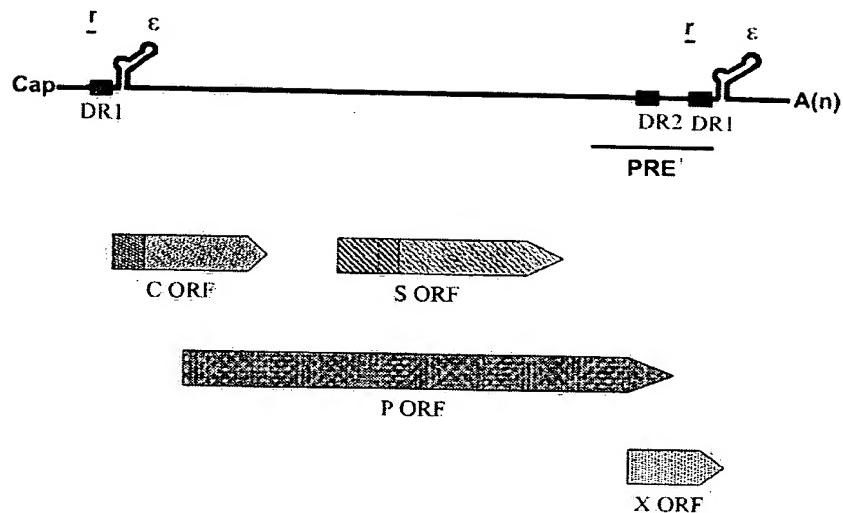
【청구항 19】

제 17 항에 있어서,

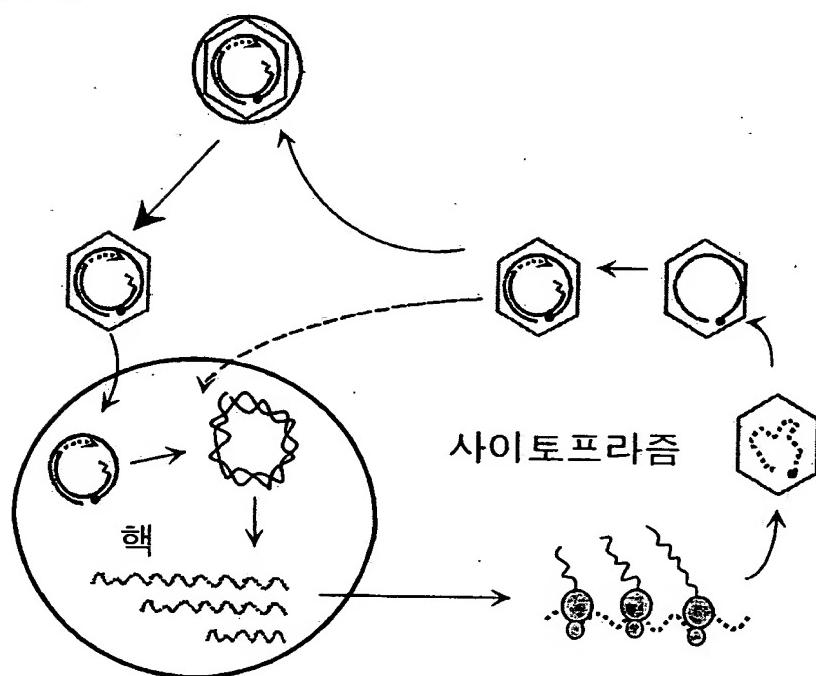
상기의 삽입할 수 있는 외부 유전자는 다양한 유전자에 대한 안티센스 유전자와 라이보자임을 포함하며, 특히 B형 간염바이러스와 C형 간염바이러스의 안티센스 유전자와 라이보자임을 만드는 유전자를 포함한다. 또한, 다양한 암 억제 유전자, 성장 인자, 호르몬, 사이토카인, 세포막 수용체, 혈액 응고 인자로 구성된 이종 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 감염 방법.

【도면】

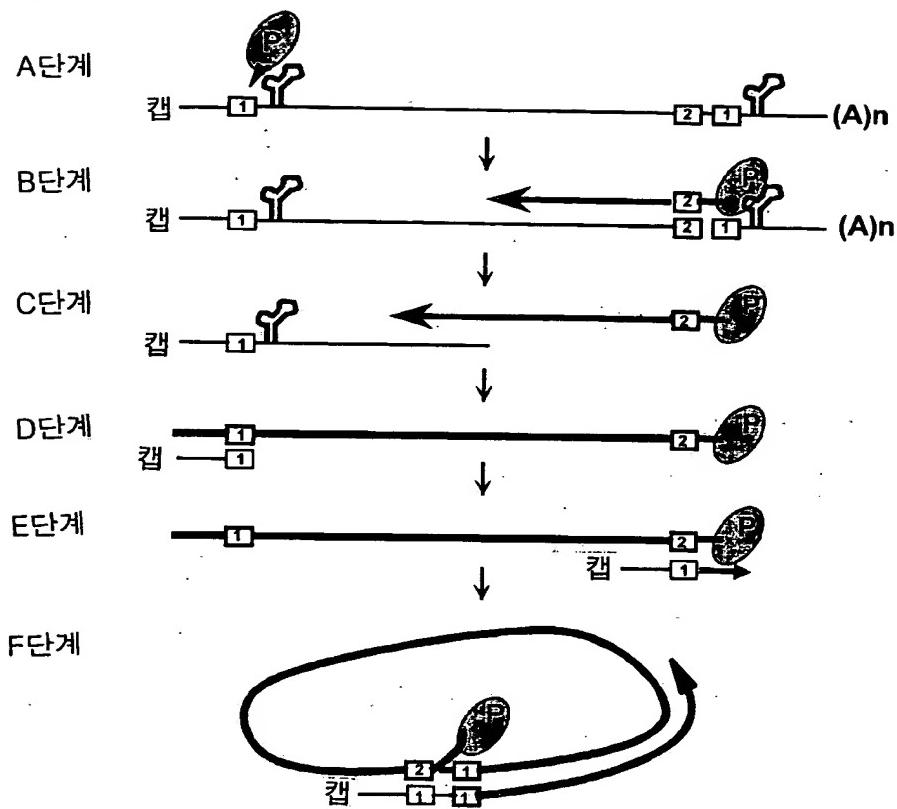
【도 1】



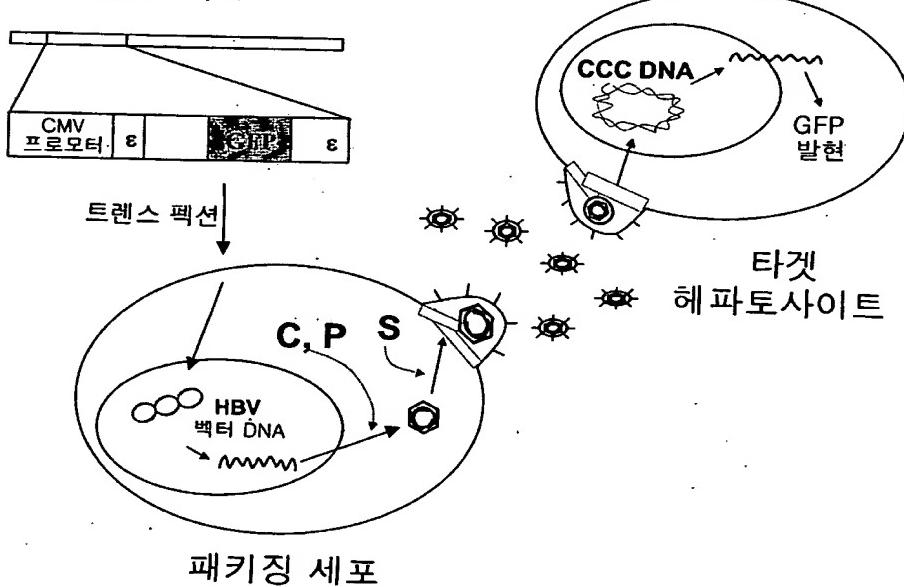
【도 2】



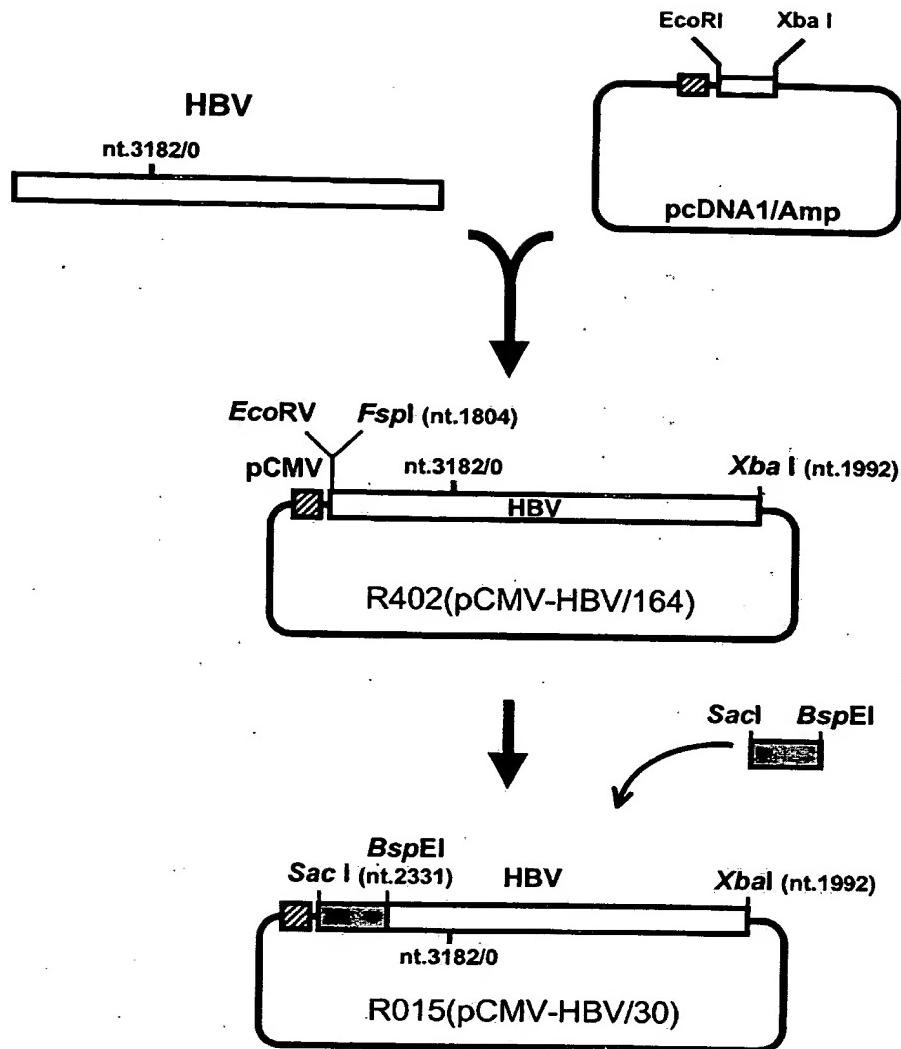
【도 3】



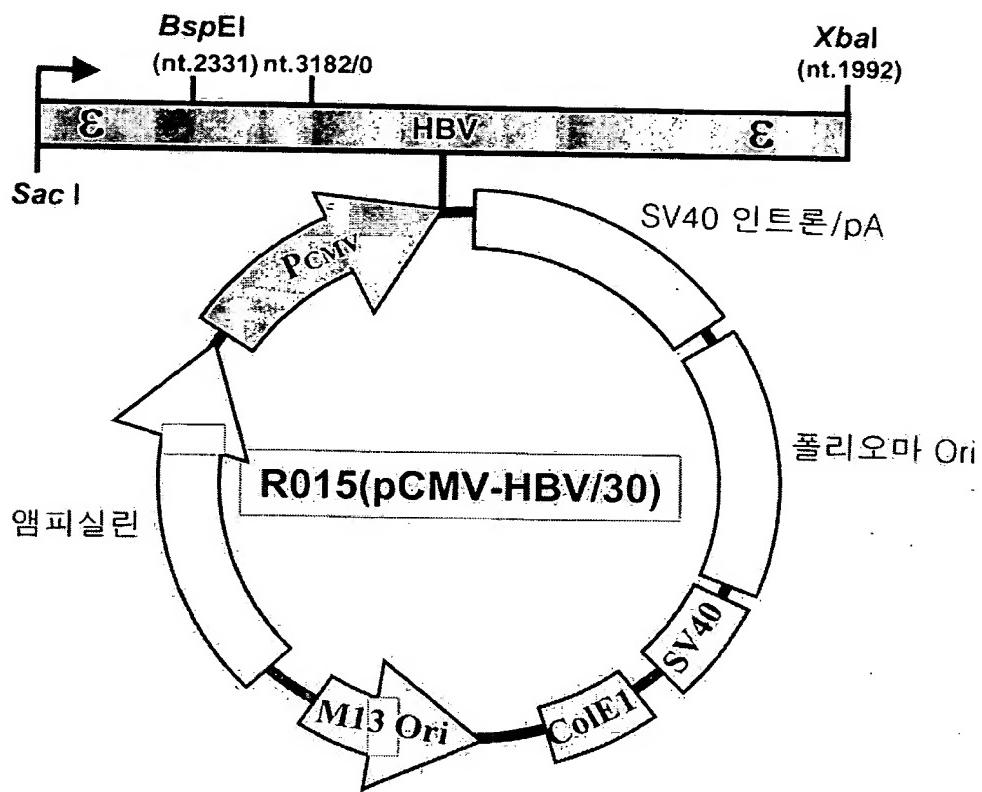
【도 4】

HBV 벡터

【도 5a】



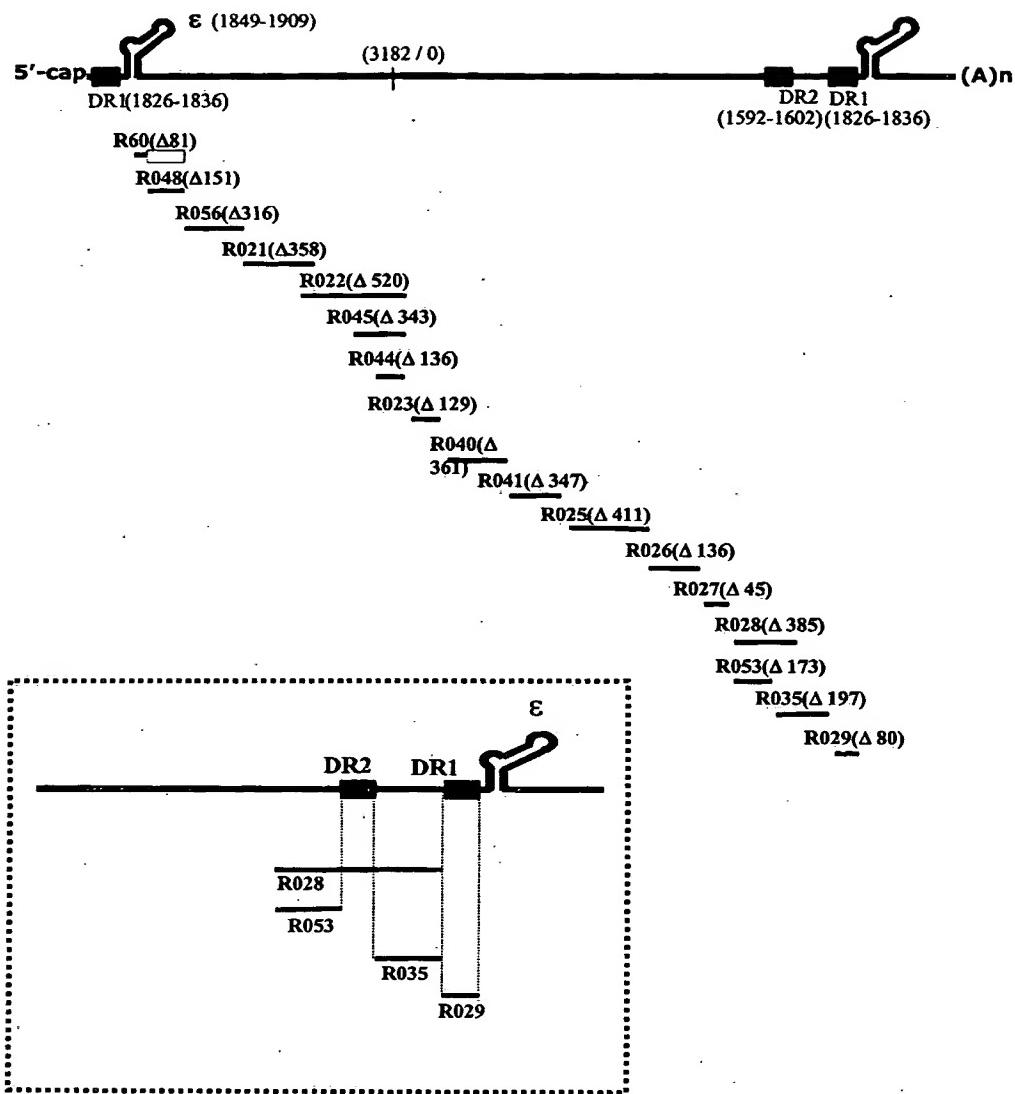
【도 5b】



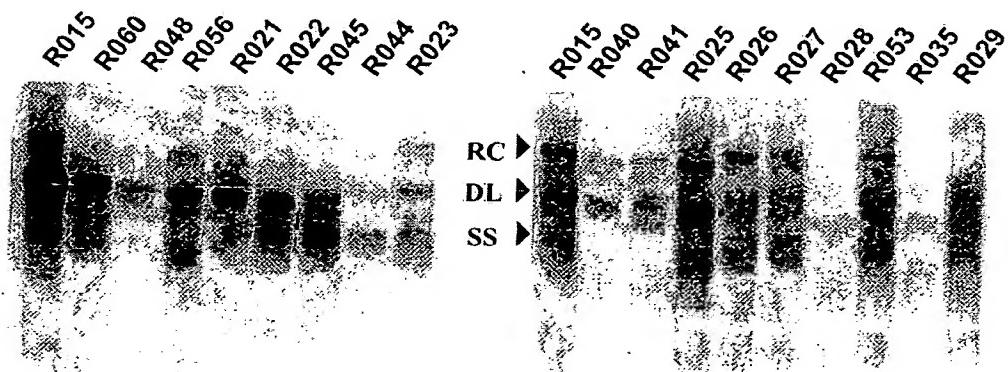
1020010019645

2001/7/1

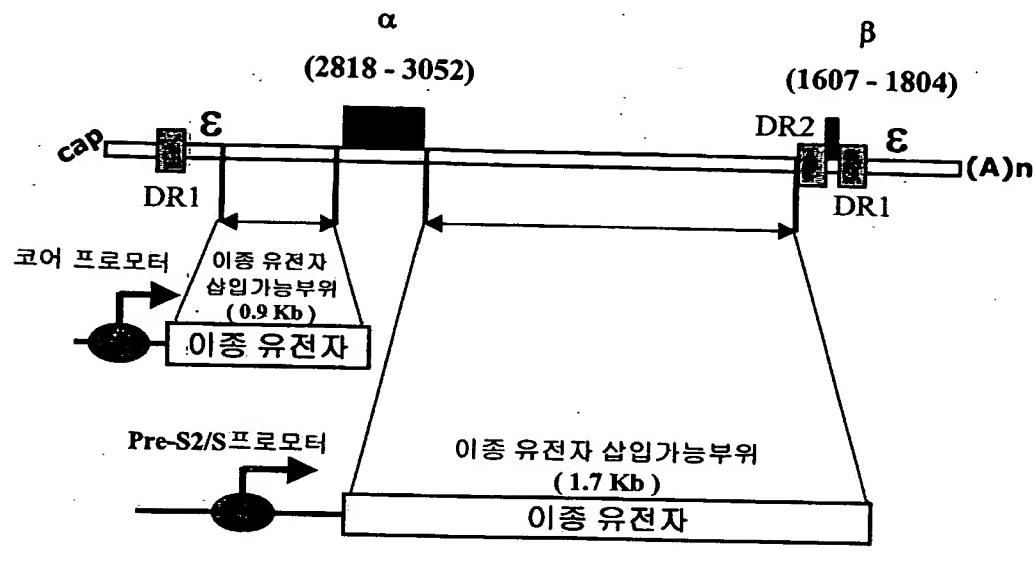
【도 6】



【도 7】

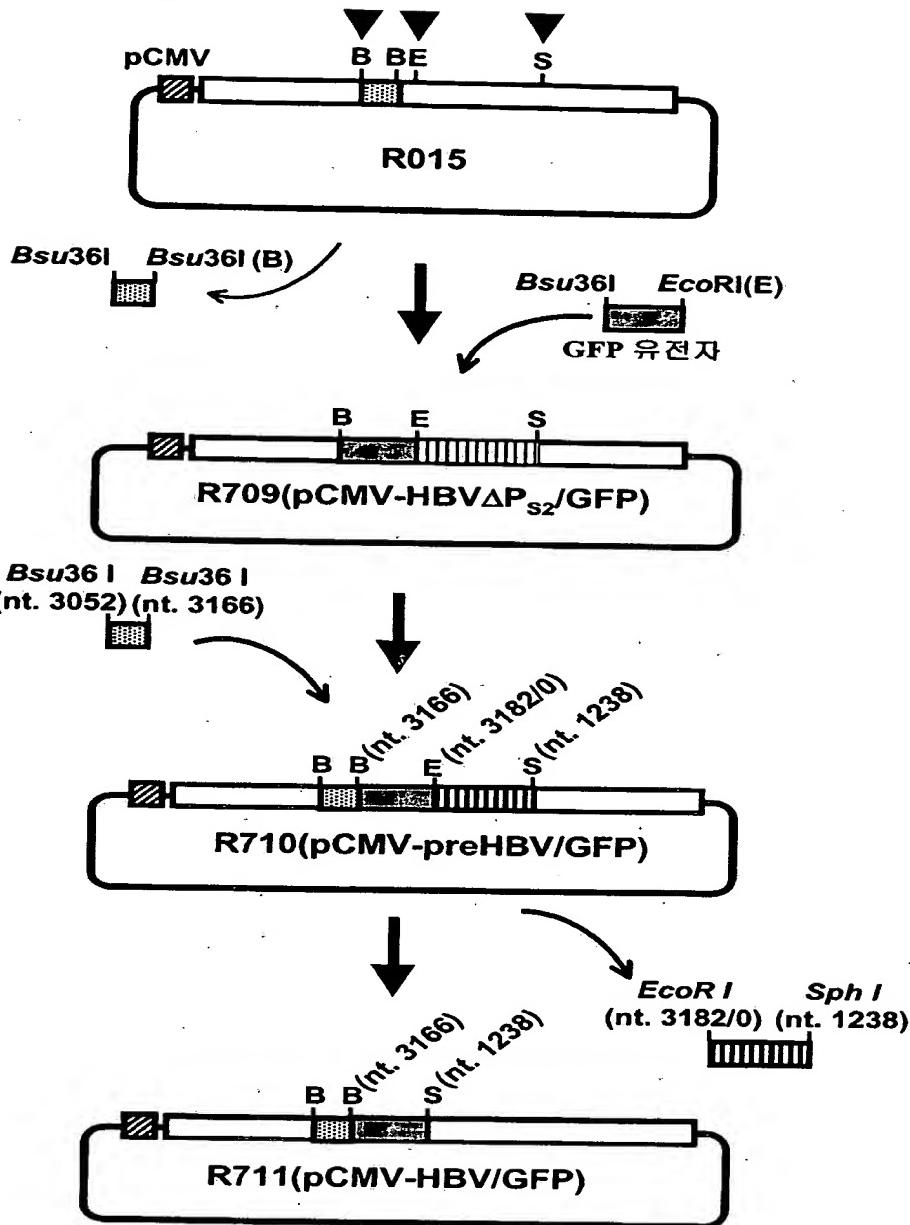


【도 8】



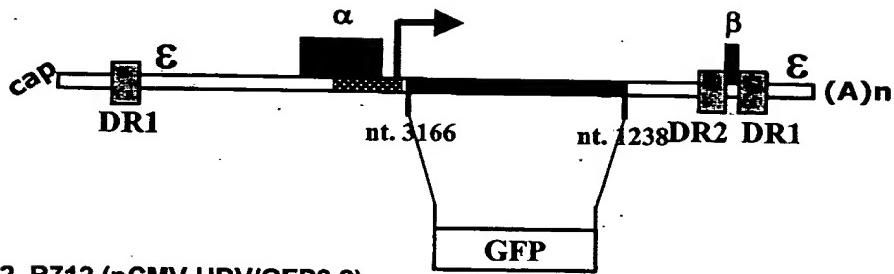
■ α, β : 시스-엘리먼트 부위

【도 9】

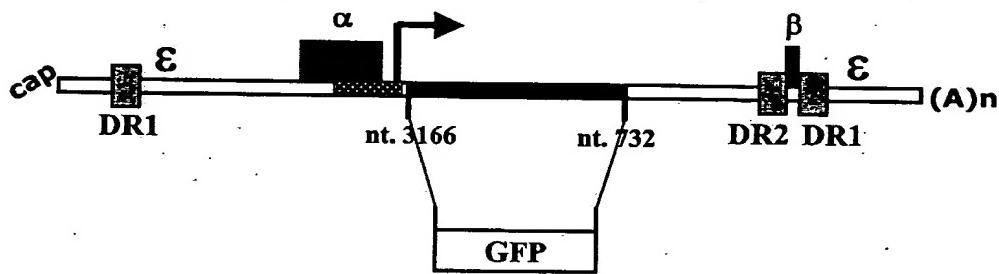


【도 10】

1. R711 (pCMV-HBV/GFP)

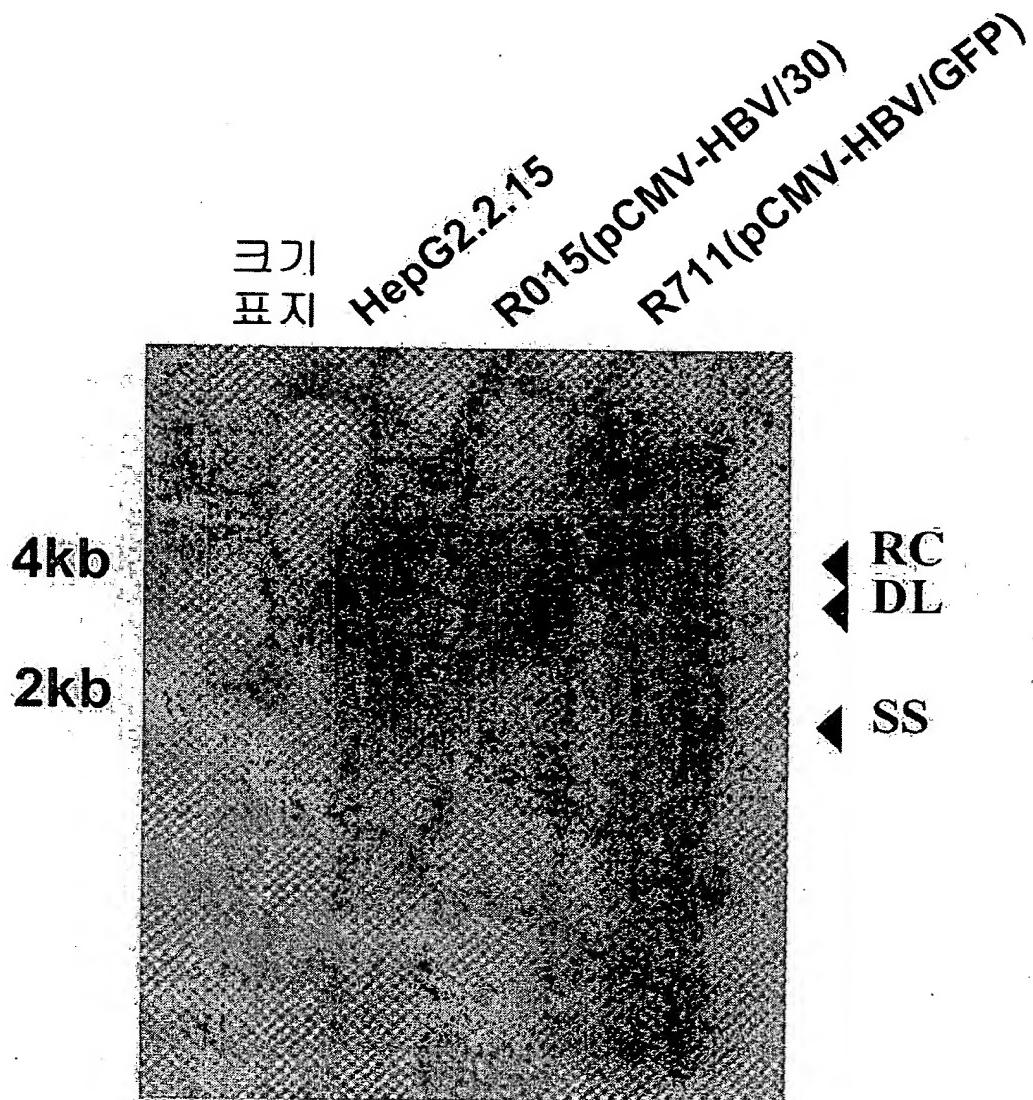


2. R712 (pCMV-HBV/GFP3.2)

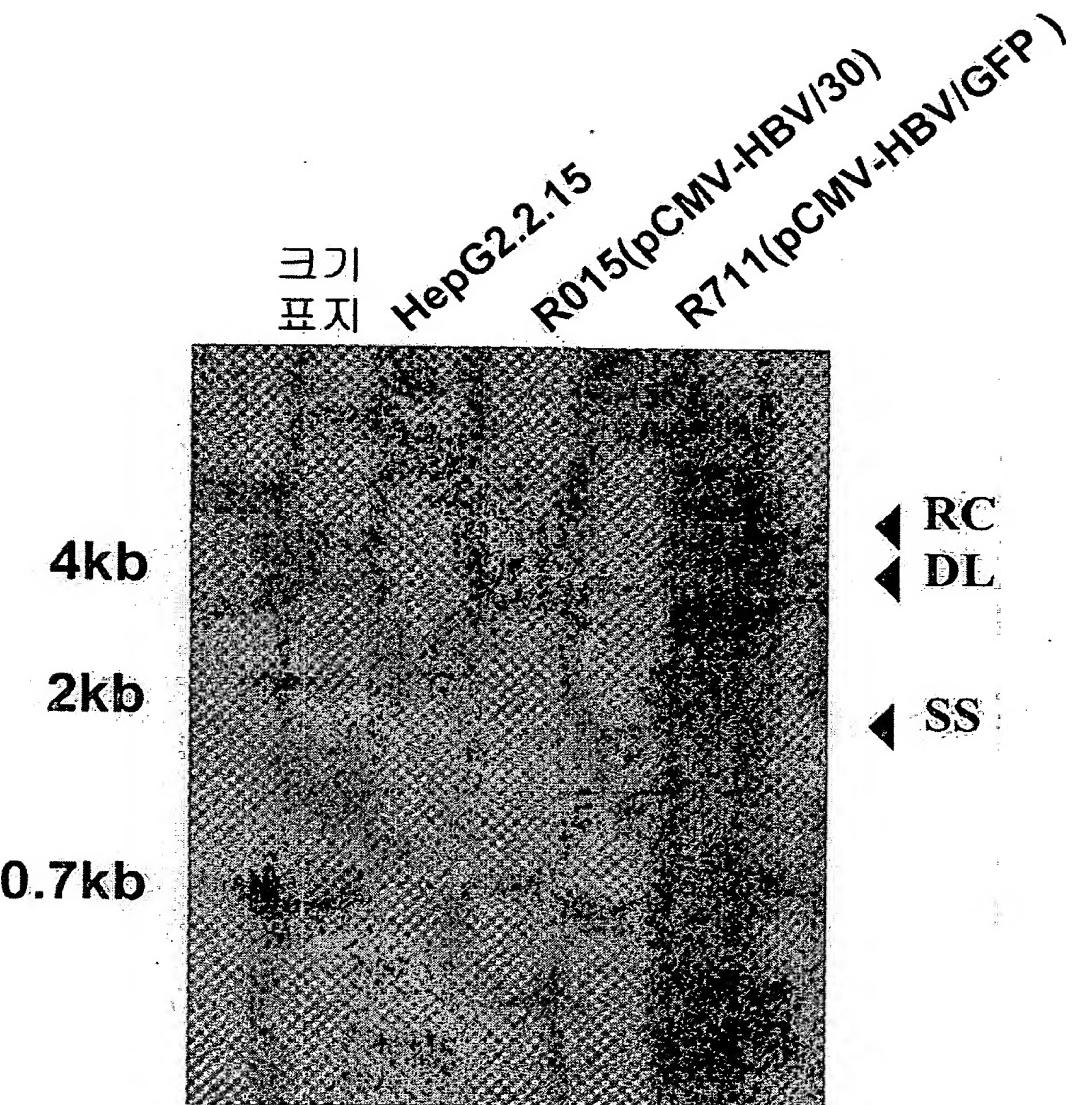


- [Diagonal lines] Pre-S2/S 프로모터 부위
- [Solid black box] α, β 시스-엘리먼트 부위
- [White box with black border] DR1, DR2
- [Solid black box] GFP (녹색형광단백질)
- [Right-pointing arrow] 전사개시 부위

【도 11a】



【도 11b】



【서열목록】

<110> RYU, WANG SHICK <120> Hepatitis B virus vectors for gene therapy <150> KR2000-21070 <151> 2000-04-20 <160> 5
 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 235 <212> DN

<213>; HBV <220>; <221>; gene <222>; (1)..(235)
<223>; Alpha-element of HBV <400>; 1 gtcaccatat tcttggaaac aagatctac
gcatggggca gaatcttcc accagcaatc 60 ctctgggatt cttcccgac caccagttgg
atccagcctt cagagcaaac accgcaaatc 120 cagattggga cttcaatccc aacaaggaca
cctggccaga cgccaacaag gtaggagctg 180 gagcattcgg gctgggttc accccaccgc
acggaggcct tttgggtgg agccc 235 <210>; 2 <211>; 197
<212>; DNA <213>; HBV <220>; <221>; gene <222>;
(1)..(197) <223>; Beta- element of HBV <400>; 2 gcatggagac caccgtgaa
gcccaccaaa tattgccaa ggtcttacat aagaggactc 60 ttggactctc agcaatgtca
acgaccgacc ttgaggcata cttcaaagac tgggggttt 120 aagactggga ggagtgggg
gaggagatta gtttaaaggt cttgtacta ggaggctgta 180 ggcataaatt ggtctgc
197 <210>; 3 <211>; 8007 <212>; DNA <213>; HBV
<220>; <221>; gene <222>; (1)..(8007) <223>; Prototype
vector of HBV <400>; 3 aacttttca cctctgccta atcatctttt gttcatgtcc tactgttca
gcctccaagc 60 tgtgccttgg gtggcttgg ggcattggaca tcgaccctta taaagaattt
ggagctactg 120 tggagttact ctcgttttg cttctgact tctttccttc agtacgagat
cttcttagata 180 ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca
cctcaccata 240 ctgcactcag gcaagcaatt cttgctggg ggaaactaat gactcttagct
acctgggtgg 300 gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag accttagtagt cagttatgtc
aacactaata 360 tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgggt ttcacatttc ttgtctcact
tttggaaagag 420 aaacagttat agagtattt ggtgtttcg gagtgtggat tcgcactcct

ccagctata 480 gaccacaaa tgcccatac ctatcaacac ttccggagac tacttgttt
agacgacgag 540 gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctcgcagacg aaggctcaa
tcgccgcgtc 600 gcagaagatc tcaatctcggaatctcaat gtttagtattc cttggactca
taaggtgggg 660 aactttactg ggctttattc ttctactgta cctgtcttta atcctcattg
gaaaacacca 720 tctttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca
gtttgttagc 780 ccactcacag ttaatgagaa aagaagattt caattgatta tgcctgccag
gttttatcca 840 aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc
agaacatcta 900 gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc
ggtatattt 960 tataagagag aaacaacaca taggcctca ttttgtgggt caccatattc
ttggaaacaa 1020 gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct
ttcccgacca 1080 ccagttggat ccagcctca gagcaaacac cgcaaattcca gattggact
tcaatccaa 1140 caaggacacc tggccagacg ccaacaagg aggagctgga gcattcgggc
tggtttcac 1200 cccaccgcac ggaggcctt tgggtggag ccctcaggct cagggcatac
tacaaacttt 1260 gccagcaaat ccgcctcctg cctccaccaa tcgcccgtca ggaaggcagc
ctacccgct 1320 gtctccacct ttgagaaaca ctcatcctca ggcattgcag tggattcca
caaccccca 1380 ccaaactctg caagatccca gagtgagagg cctgtatttc cctgctgggt
gctccagttc 1440 aggaacagta aaccctgttc tgactactgc ctctccctt tcgtcaatct
tctcgaggat 1500 tggggaccct gcgcgtgaaca tggagaacat cacatcagga ttcctaggac
cccttctcg 1560 gttacaggcg gggttttct tggacaag aatcctcaca ataccgcaga
gtcttagactc 1620 gtgggtggact tctctcaatt ttcttaggggg aactaccgtg tgtcttgcc
aaaattcgca 1680 gtccccaacc tccaaatcact caccaacactc ttgcctcca acttgcctg

gttatacgctg 1740 gatgtgtctg cggcggttta tcacatccctt cttcatcctg ctgcgtatgc
tcatcttctt 1800 gttgggttctt ctggactatc aaggtatgtt gcccggttgt cctctaattc
caggatcctc 1860 aacaaccagc acgggaccat gccggacactg catgactact gctcaaggaa
cctctatgta 1920 tccctcctgt tgctgtacca aacccatcgga cgaaaattgc acctgtattc
ccatccccatc 1980 atcctgggct ttcggaaaaat tcctatggga gtgggcctca gcccgtttct
cctggctcag 2040 tttacttagtg ccatttggtc agtggttcgt agggctttcc cccactgttt
ggcttcagt 2100 tatatggatg atgtggtatt gggggccaag tctgtacagc atcttgagtc
ccttttacc 2160 gctgttacca atttctttt gtcttgggt atacattaa accctaacaa
aacaagaga 2220 tggggttact ctctaaattt tatgggttat gtcattggat gttatgggtc
cttgccacaa 2280 gaacacatca tacaaaaaat caaagaatgt ttttagaaaac ttcttattaa
caggcctatt 2340 gattggaaag tatgtcaacg aattgtgggt ctttgggtt ttgctgcccc
ttttcaccaa 2400 tgtggttatc ctgcgttgc gcctttgtat gcatgttattc aatctaagca
ggcttcact 2460 ttctcgccaa cttacaaggc ctgttgtt aaacaatacc tgaaccttta
ccccgttgcc 2520 cggcaacggc caggtctgtg ccaagtgtt gctgacgcaa cccccactgg
ctggggcttg 2580 gtcatgggcc atcagcgcat gcgtggaaacc tttcggctc ctctggcgat
ccatactgct 2640 gaactcctag ccgttgtt tgctcgacgc aggtctggag caaacattat
cgggactgat 2700 aactctgttgc tcctatcccg caaatataca tcgtttccat ggctgcttagg
ctgtgctgcc 2760 aactggatcc tgcgccggac gtcctttgtt tacgtccctgt cggcgctgaa
tcctgccggac 2820 gacccttctc ggggtcgctt gggactctct cgtcccttc tccgtctgcc
gttccgaccg 2880 accacggggc gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca
tctgccggac 2940 cgtgtgcact tcgcttcacc tctgcacgac gcatggagac caccgtgaac

gcccaccaaa 3000 tattgcccaa ggtttacat aagaggactc ttggactctc agcaatgtca
acgaccgacc 3060 ttgaggcata cttcaaagac ttttttta aagactggga ggagtgggg
gaggagatta 3120 ggttaaaggt cttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgcgca
ccagcaccat 3180 gcaactttt cacccttgcc taatcatctc ttgttcatgt cctactgttc
aagcctccaa 3240 gctgtgcctt gggggctt ggggcatgga catgaccct tataaagaat
ttggagctac 3300 tgtggagtt ctctcgaaa tgcctctga ctttttcct tcagtacgag
atcttctaga 3360 gggccctatt ctatagtgtc acctaaatgc tagaggatct ttgtgaagga
accttacttc 3420 tgtggtgtga cataattgga caaactacct acagagattt aaagctctaa
ggtaaatata 3480 aaattttaa gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttgtgt
attttagatt 3540 ccaacciatg gaactgatga atgggagcag tgggtggatg ccttaatga
ggaaaacctg 3600 ttttgctcag aagaaatgcc atctagtgtat gatgaggcta ctgctgactc
tcaacattct 3660 actcctccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccccaagg acttccttc
agaattgcta 3720 agtttttga gtcgtgtgt gtttagtaat agaactcttgc ttgccttgc
tatttacacc 3780 acaaaggaaa aagctgcact gctataacaag aaaattatgg aaaaatattt
gatgtatagt 3840 gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacattgtt gaggtttac
ttgctttaaa 3900 aaaccccca caccccccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattt
ttgttgttaa 3960 cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa
atttcacaaa 4020 taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggttgtcc aaactcatca
atgtatctta 4080 tcgtgtctgg atcatccgc catggtatca acgcccattt tctatttaca
gtagggacct 4140 cttcggttgtg taggtaccgc tgtattccta gggaaatagt agaggcacct
tgaactgtct 4200 gcatcagcca tatagcccccc gctgttcgac ttacaaacac aggcacagta

ctgacaaacc 4260 catacacctc ctctgaaata cccatagttt ctagggctgt ctccgaactc
attacaccct 4320 ccaaagtcaag agctgttaatt tcgccatcaa gggcagcgag ggcttctcca
gataaaaatag 4380 cttctgccga gagtcccgtt agggtagaca cttcagctaa tccctcgatg
aggctacta 4440 gaatagtcag tgccgcctcc attttggaaaa ttcaacttact tcatcagctt
cagaagatgg 4500 cgaggggcct ccaacacagt aattttcctc ccgactctta aaatagaaaa
tgtcaagtca 4560 gtttaaggcagg aagtggacta actgacgcag ctggccgtgc gacatcctct
ttaattagt 4620 tgcttaggcaa cgccctccag agggcgtgtg gttttgcaag aggaagcaaa
agcctctcca 4680 cccaggccta gaatgttcc acccaatcat tactatgaca acagctgttt
tttttagtat 4740 taagcagagg ccggggaccc ctggggccggc ccgttactc tggagaaaaaa
gaagagaggc 4800 attgttagagg cttccagagg caacttgtca aaacaggact gcttctattt
ctgtcacact 4860 gtctggccct gtacacaaggt ccagcacctc cataccccct ttaataagca
gttgggaac 4920 gggtgcggtt cttaactccgc ccatccgccc cctaactccg cccagttccg
ccattctcc 4980 gccccatggc tgactaattt tttttattna tgcaaggcc gaggccgcct
cggcctctga 5040 gctattccag aagtagtgag gaggctttt tggaggccta ggctttgca
aaaagctaat 5100 tcggcgtaat ctgctgcttgc caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg
gtttgttgc 5160 cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg ctgcagcaga
gcgcagatac 5220 caaatactgt cttcttagtg tagccgtgt taggccacca cttcaagaac
tctgttagcac 5280 cgcctacata cctcgctctg ctaatccgtt taccagtggc tgctgccagt
ggcgataagt 5340 cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgtt agttaccgga taaggcgcag
cggtcgggct 5400 gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc
gaactgagat 5460 acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttccgaa agggagaaaa

gcggacaggt 5520 atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca
gggggaaacg 5580 cctggtatct ttatagtctt gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt
cgattttgt 5640 gatgctcgtc agggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcaagc
tagcttctag 5700 ctagaaattt taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaattttt
ttaaatcagc 5760 tcattttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa
agaatagccc 5820 gagataggggt tgagtgttgt tccagttgg aacaagagtc cactattaaa
gaacgtggac 5880 tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccgccact
acgtgaacca 5940 tcacccaaat caagttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg
gaaccctaaa 6000 gggagcccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag
aaaggaaggg 6060 aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac
gctgcgcgt 6120 accaccacac ccggcgcgtc taatgcgccg ctacagggcg cgtactatgg
ttgctttgac 6180 gagaccgtat aacgtgcttt cctcggttggaa atcagagcgg gagctaaaca
ggaggccgat 6240 taaaggatt ttagacagga acggtacgcc agctggatta ccaaagggcc
tcgtgatacg 6300 cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag
gtggcacttt 6360 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttgg tttatttttc taaatacatt
caaatatgta 6420 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaaa
ggaagagtat 6480 gagtattcaa cattccgtc tcggccttat tccctttttt gcggcatttt
gccttcctgt 6540 tttgctcac ccagaaacgc tggtaaagt aaaagatgct gaagatcagt
tgggtgcacg 6600 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc cttgagagtt
ttcgccccga 6660 agaacgtttt ccaatgatga gcactttaa agttctgcta tgtggcgcgg
tattatcccg 6720 tggtgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga

atgacttggt 6780 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa
gagaattatg 6840 cagtgcgtcc ataaccatga gtgataaac ac tgcggccaac ttacttctga
caacgatcg 6900 aggaccgaag gagctaaccg ct ttttgca caacatgggg gatcatgtaa
ctcgccttga 6960 tcgttggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca
ccacgatgcc 7020 tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta
ctctagcttc 7080 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac
ttctgcgctc 7140 ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc
gtgggtctcg 7200 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag
ttatctacac 7260 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga
taggtgcctc 7320 actgattaag catggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt
agattgattt 7380 aaaacttcat tttaatttc tctagcgcgt tgacattgat tattgactag
ttattaaatg 7440 taatcaatta cgggttcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt
tacataactt 7500 acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gcccattgac
gtcaataatg 7560 acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg
ggtggactat 7620 ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag
tacgccccct 7680 attgacgtca atgacggtaa atggccgc tggcattatg cccagtagat
gaccttatgg 7740 gacttccta cttggcagta catctacgtt ttagtcatcg ctattaccat
ggtgatgcgg 7800 tttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggttgact cacggggatt
tccaagtctc 7860 cacccattt acgtcaatgg gagtttggg tggcacaaa atcaacggga
cttccaaaa 7920 tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atggcggta ggcgtgtacg
gtgggaggtc 7980 tatataagca gagctctctg gcttaact

8007 < 210>; 4 < 211>; 8717 < 212>; DNA < 213>;
Artificial Sequence < 220>; < 223>; R711: pCMV-HBV/GFP Full Sequence
< 400>; 4 aacttttca cctctgccta atcatctt gttcatgtcc tactgttcaa gcctccaagc
60 tgtgccttgg gtggcttgg ggcattggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctactg 120
tgaggatctact ctcgttttgc cttctgact tcttccttc agtacgagat cttctagata 180
ccgcctcagc tctgtatcgga aagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240
ctgcactcag gcaagcaatt ctgtctggg gggactaat gactctagct acctgggtgg 300
gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360
tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgttgg ttcacatttc ttgtctcaact tttggaagag 420
aaacagttat agagtatttgc gtgtcttgc gagtgtggat tcgcactcct ccagcttata 480
gaccaccaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgtgtt agacgacgag 540
gcaggcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcagacg aaggctcaa tcgcccgcgtc 600
gcagaagatc tcaatctcgga aatctcaat gtttagtattc cttggactca taaggtgggg 660
aactttactg ggcttatttc ttctactgta cctgttttta atcctcattt gaaaacacca 720
tctttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gttttaggc 780
ccactcacag ttaatgagaa aagaagattt caattgatta tgcctgccag gtttatcca 840
aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900
gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc gggtatatta 960
tataagagag aaacaacaca tagcgccctca ttttgtgggt caccatattc ttgggaacaa 1020
gatctacagc atggggcaga atcttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacca 1080
ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattgggact tcaatccaa 1140

1020010019645

2001/7/1

caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tggtttcac	1200
cccaccgcac ggaggcctt tgggtggag ccctcaggct cagggcatac tacaaactt	1260
gccagcaa at ccgcctcctg cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgct	1320
gtctccacct ttgagaaaca ctcatcctca ggagatgagt aaaggagaag aactttcac	1380
tggagttgtc ccaattctt ttagaatttga tggtgatgtt aatggcaca aatttctgt	1440
cagtggagag ggtgaaggtg atgcaacata cgaaaaactt acccttaat ttatttgac	1500
tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgtact actttcttt atgggttca	1560
atgctttca agatacccg atcatatgaa acagcatgac ttttcaaga gtgccatgcc	1620
cgaaggttat gtacaggaaa gaactatatt tttcaaagat gacggaaact acaagacacg	1680
tgctgaagtc aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga	1740
ttttaagaa gatggaaaca ttcttgaca caaattggaa tacaactata actcacacaa	1800
tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaa gttaacttca aaattagaca	1860
caacattgaa gatggaagcg ttcaacttagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg	1920
cgtatggccct gtcctttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg cccttcgaa	1980
agatcccaac gaaaagagag accacatggt cttcttgag tttgtAACAG ctgctggat	2040
tacacatggc atggatgaac tatacaaata aggaattcca caacatttca ccaaactctg	2100
caagatccca gagtgagagg cctgtatttc cctgctggtg gctccagttc aggaacagta	2160
aaccctgttc tgactactgc ctctccctt aCGTCAATCT TCTCGAGGAT tggggaccct	2220
gcgcgtgaaca tggagaacat cacatcagga ttcctaggac cccttctcgt gttacaggcg	2280
gggttttct tggacaag aatcctcaca ataccgcaga gtctagactc gtggtgact	2340
tctctcaatt ttcttaggggg aactaccgtg tgtcttggcc aaaattcgca gtccccaaacc	2400

tccaaatcact caccaacctc ttgtcctcca acttgcctg gttatcgctg gatgtgtctg	2460
cggcgttta tcatcttcct cttcatcctg ctgctatgcc tcatcttctt gttggttctt	2520
ctggactatc aaggtatgtt gcccgttgtt cctctaattc caggatcctc aacaaccagc	2580
acgggaccat gccggacactg catgactact gctcaaggaa cctctatgta tccctcctgt	2640
tgctgtacca aacccatcgga cgaaaattgc acctgtattc ccatccatc atcctgggct	2700
ttcggaaaat tcctatggga gtgggcctca gcccgttct cctggcttag tttacttagtg	2760
ccattttgttc agtggttcgt agggcttcc cccactgttt ggcttcagt tatatggatg	2820
atgtggtatt gggggccaag tctgtacagc atcttgagtc ccttttacc gctgttacca	2880
atttcttt gtcttgggt atacattaa accctaaca aacaaagaga tggggttact	2940
ctctaaattt tatggttat gtcattggat gttatggtc cttgccacaa gaacacatca	3000
tacaaaaaat caaagaatgt tttagaaaac ttccattaa caggcctatt gattggaaag	3060
tatgtcaacg aattgtgggt ctttgggtt ttgctgcccc tttcacaca tggttatac	3120
ctgcgttcat gcctttgtat gcatgtattc aatctaagca ggcttcact ttctcgccaa	3180
cttacaaggc cttctgtgt aaacaatacc tgaacctta ccccggtgcc cgcaacggc	3240
caggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa ccccaactgg ctggggcttg gtcatggcc	3300
atcagcgcac gcgtggaacc tttcggctc ctctggcat ccatactgca gaactcctag	3360
ccgcttgttt tgctcgcagc aggtctggag caaacattat cgggactgat aactctgttg	3420
tcctatcccg caaatataca tcgttccat ggctgctagg ctgtgctgcc aactggatcc	3480
tgcgcgggac gtccttggtt tacgtccgt cggcgctgaa tcctgcggac gacccttctc	3540
ggggtcgctt gggactctct cgtcccttc tccgtctgcc gttccgaccg accacggggc	3600
gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca tctgcggac cgtgtgcact	3660

1020010019645

2001/7/1

tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggagac caccgtgaac gcccaccaaa tattgcccaa	3720
ggtcttacat aaggaggactc ttggactctc agcaatgtca acgaccgacc ttgaggcata	3780
cttcaaagac tgtttgtta aagactggga ggagttgggg gaggagatta gttaaaggt	3840
cttgtacta ggaggctgta ggcataaattt ggtctgcgca ccagcaccat gcaactttt	3900
cacctctgcc taatcatctc ttgttcatgt cctactgttc aagcctccaa gctgtgcctt	3960
gggtggctt gggcatgga catcgaccct tataaagaat ttggagctac tgtggagtta	4020
ctctcgaaaa tgccttctga ctttttcc tcagtagcgg atcttctaga gggccctatt	4080
ctatagtgtc acctaaatgc tagaggatct ttgtgaagga accttacttc tgtgggtgtga	4140
cataatttggaa caaactacct acagagattt aaagctctaa ggtaaatata aaatttttaa	4200
gtgtataatg tgtaaacta ctgattctaa ttgtttgtt atttttagatt ccaacctatg	4260
gaactgatga atgggagcag tggtggaatg ctttaatga ggaaaacctg tttgctcag	4320
aagaaatgcc atctagtgtat gatgaggcta ctgctgactc tcaacattct actcctccaa	4380
aaaagaagag aaaggtagaa gaccccaagg acttccttc agaattgcta agtttttga	4440
gtcatgctgt gttagtaat agaactcttgc ttgctttgc tatttacacc acaaaggaaa	4500
aagctgcact gctatacaag aaaattatgg aaaaatattt gatgtatagt gccttgacta	4560
gagatcataa tcagccatac cacatttgc gaggtttac ttgctttaaa aaacctcccc	4620
cacccccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattt tggtttaa ctgttttatt	4680
gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt	4740
ttttcactgc attctagttt tggtttgtcc aaactcatca atgtatctt tcatgtctgg	4800
atcatccgc catggtatca acgccccattt tctattaca gtagggaccc ttgcgttgt	4860
taggtaccgc tgtattccta gggaaatagt agaggcacct tgaactgtct gcatcagcca	4920

1020010019645

2001/7/1

tatagccccc gctgttcgac ttacaaacac aggcacagta ctgacaaacc catacacctc 4980
ctctgaaata cccatagttg ctagggctgt ctccgaactc attacaccct ccaaagtcag 5040
agctgtatt tcgccatcaa gggcagcgag ggcttctcca gataaaatag cttctgccga 5100
gagtcccgta aggtagaca cttcagctaa tccctcgatg aggtctacta gaatagtcag 5160
tgcggctccc atttgaaaa ttcaactact tgatcagctt cagaagatgg cggagggcct 5220
ccaacacagt aatttcctc ccgactctta aaatagaaaa tgtcaagtca gttaaggcagg 5280
aagtggacta actgacgcag ctggccgtgc gacatcctct ttaatttagt tgctaggcaa 5340
cgccctccag agggcgtgtg gtttgcaag aggaagcaaa agcctctcca cccaggccta 5400
gaatgtttcc acccaatcat tactatgaca acagctgtt ttttagtat taagcagagg 5460
ccggggaccc ctgggccggc ccgcctactc tggagaaaaa gaagagaggc attgttagagg 5520
cttccagagg caacttgtca aaacaggact gcttctattt ctgtcacact gtctggccct 5580
gtcacaaggt ccagcacctc cataccccct ttaataagca gtttggAAC gggtgccgggt 5640
cttactccgc ccatcccgcc cctaactccg cccagttccg cccattctcc gccccatggc 5700
tgactaattt ttttattta tgtagaggcc gagggccct cggcctctga gctattccag 5760
aagtagtgag gaggctttt tggaggccta ggctttgca aaaagctaatt tcggcgtaat 5820
ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttggcgc cggatcaaga 5880
gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 5940
ccttcttagtg tagccgtat taggccacca cttcaagaac tctgttagcac cgcc tacata 6000
cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac 6060
cggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcggtc gaacgggggg 6120
ttcgtgcaca cagccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 6180

tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccgtaag 6240
cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct 6300
ttatagtctt gtcgggttc gccacctctg actttagcgt cgattttgt gatgctcgta 6360
agggggcgaa agcctatgga aaaacgccag caacgcaagc tagttctag cttagaaattg 6420
taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaattttt 6480
accatataggc cgaaatcgcc 6540
ttagtgttgt tccagttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca 6600
aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccgcccact acgtgaacca tcacccaaat 6660
caagttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg 6720
gatttagagc ttgacggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggaaagaaagcga 6780
aaggagcgaa cgcttagggcg ctggcaagt 6840
ccgccccgct taatgcgcgcg ctacagggcg cgtactatgg ttgcttgac gagaccgtat 6900
aacgtgctt cctcggttga atcagagcg 6960
tttagacagga acggtaacg 7020
taggttaatg tcatgataat aatggttct tagacgtcag gtggcactt tcggggaaat 7080
gtgcgcggaa cccctattt 7140
agacaataac cctgataat gctcaataa tattaaaaa ggaagagtat ggttttca 7200
cattccgtg tcgccttat tccctttt gcggcattt gccttcgtt tttgctcac 7260
ccagaaacgc tggtaaagt aaaagatgct 7320
atcgaactgg atctcaacag cgtaagatc cttgagatgtt ttcggccgaa agaacgtttt 7380
ccaatgatga gcactttaa agttctgcta tgtggcg 7440

gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggc tgagtactca 7500
ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 7560
ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 7620
gagctaaccg ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgcgccttga tcgttggaa 7680
ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgcagcaatg 7740
gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 7800
ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgcctc ggcccttccg 7860
gctggctggc ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 7920
gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 7980
caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 8040
cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 8100
tttaatttc tctagcgcgt tgacattgat tattgacttag ttattaatag taatcaatta 8160
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg 8220
gcccgctgg ctgaccgccc aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc 8280
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa 8340
ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccctt attgacgtca 8400
atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta 8460
cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt 8520
acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaaatctc cacccattg 8580
acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaaca 8640
actccgcccc attgacgcaa atggcggtta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca 8700

1020010019645

2001/7/1

gagctctctg gctaact 8717
<210> 5 <211> 7991 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> R712: pCMV-HBV/GFP3.2 Full Sequence <400>
5 aacttttca cctctgccta atcatctttt gttcatgtcc tactgttcaa gcctccaagc 60
tgtgccttgg gtggcttgg ggcatggaca tcgaccctta taaagaattt ggagctactg . 120
tggagttact ctcgttttg ccttctgact tcttccttc agtacgagat cttctagata 180
ccgcctcagc tctgtatcgg gaagccttag agtctcctga gcattgttca cctcaccata 240
ctgcactcag gcaagcaatt ctttgctggg gggactaat gactctagct acctgggtgg 300
gtgttaattt ggaagatcca gcgtctagag acctagtagt cagttatgtc aacactaata 360
tgggcctaaa gttcaggcaa ctcttgggt ttcacatttc ttgtctcact tttggaagag 420
aaacagttat agagtatttg gtgtcttcg gagtgtggat tcgcactcct ccagcttata 480
gaccaccaaa tgcccctatc ctatcaacac ttccggagac tactgtgtt agacgacgag 540
gcaggtcccc tagaagaaga actccctcgc ctgcagacg aaggtctcaa tcgcccgcgtc 600
gcagaagatc tcaatctcgg gaatctcaat gtttagtattc cttggactca taaggtgggg 660
aactttactg ggcttattt tcctactgta cctgtttta atcctcattt gaaaacacca 720
tctttccta atatacattt acaccaagac attatcaaaa aatgtgaaca gttttaggc 780
ccactcacag ttaatgagaa aagaagattt caattgatta tgcctgccag gttttatcca 840
aaggttacca aatatttacc attggataag ggtattaaac cttattatcc agaacatcta 900
gttaatcatt acttccaaac tagacactat ttacacactc tatggaaggc ggttatatta 960
tataagagag aaacaacaca tagcgccctca ttttgtgggt caccatattc ttgggaacaa 1020
gatctacagc atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacca 1080

1020010019645

2001/7/1

ccagttggat ccagccttca gagcaaacac cgcaaatcca gattggact tcaatccaa 1140
caaggacacc tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tggtttcac 1200
ccccccgcac ggaggcctt tgggtggag ccctcaggct cagggcatac tacaaacttt 1260
gccagcaaat ccgcctcctg cctccaccaa tcgccagtca ggaaggcagc ctaccccgct 1320
gtctccacct ttgagaaaca ctcatcctca ggagatgagt aaaggagaag aactttcac 1380
tggagttgtc ccaattcttg ttgaattaga tggatgtt aatggcaca aatttctgt 1440
cagtggagag ggtgaaggtg atgcaacata cgaaaaactt acccttaaat ttatggcac 1500
tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgtcact actttcttt atgggttca 1560
atgctttca agataccag atcatatgaa acagcatgac ttttcaaga gtgccatgcc 1620
cgaaggttat gtacagggaaa gaactatatt ttcaaagat gacggaaact acaagacacg 1680
tgctgaagtc aagttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga 1740
ttttaagaa gatggaaaca ttcttgaca caaattggaa tacaactata actcacacaa 1800
tgtatacatc atggcagaca aacaaaagaa tggatcaaa gttaacttca aaatttagaca 1860
caacattgaa gatggaagcg ttcaacttagc agaccattat caacaaaata ctccattgg 1920
cgatggccct gtcctttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg cccttcgaa 1980
agatcccaac gaaaagagag accacatggt cttttttagt tttgtAACAG ctgctggat 2040
tacacatggc atggatgaac tatacaata aggaattttt cagttatatg gatgtgtgg 2100
tattggggc caagtcgtt cagcatctt agtccctttt taccgctgtt accaattttc 2160
ttttgtctt ggtatacat ttaaacccta acaaaacaaa gagatgggt tactctctaa 2220
attttatggg ttatgtcatt ggtatgtt ggtccttgcc acaagaacac atcatacaaa 2280
aaatcaaaga atgtttttaga aaacttccta ttaacaggcc tattgtatgg aaagtatgtc 2340

1020010019645

2001/7/1

aacgaattgt gggcttttggtttgctg cccctttac acaatgtggtatcctgcgt	2400
tgatgcctt gtatgcattt attcaatcta agcaggctt cacttctcg ccaacttaca	2460
aggccttct gtgtaaacaa tacctgaacc ttacccgt tgcccggcaa cggccaggtc	2520
tgtgccaagt gtttgctgac gcaacccca ctggctgggg ctgggtcatggccatcagc	2580
gcatgcgtgg aacctttcg gctcctctgc cgatccatac tgcgaaactc ctagccgctt	2640
gttttgctcg cagcaggctt ggagcaaaca ttatcgggac tgataactct gttgtcctat	2700
cccgcaaata tacatcgaaaatccatggctgc taggctgtgc tgccaaactgg atcctgcg	2760
ggacgtcctt tgtttacgtc ccgtcggcgc tgaatcctgc ggacgaccct tctcggggtc	2820
gcttgggact ctctcgccc cttctccgtc tgccgttccg accgaccacg gggcgcaccc	2880
ctcttacgc ggactccccg tctgtgcctt ctcatctgcc ggaccgtgtg cacttcgctt	2940
cacctctgca cgtcgcatgg agaccaccgt gaacgcccac caaatattgc ccaaggtctt	3000
acataagagg actcttggac tctcagcaat gtcaacgacc gaccttgagg catacttcaa	3060
agactgtttg tttaaagact gggaggagtt gggggaggag attagttaa aggtcttgt	3120
actaggaggc tgttaggcata aattggctg cgcaccagca ccatgcaact tttcacctc	3180
tgcctaataca tctcttggc atgtcctact gttcaaggct ccaagctgtg cttgggtgg	3240
ctttgggca tggacatcga cccttataaa gaatttgag ctactgtgga gttactctcg	3300
ttttgcctt ctgacttctt tcctttagta cgagatcttc tagagggccc tattctatag	3360
tgtcacctaa atgcttagagg atctttgtga aggaaccta cttctgtgggt gtgacataat	3420
tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat	3480
aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatTTTtta gattccaacc tatggaaactg	3540
atgaatggga gcagtggtgg aatgcctta atgaggaaaa cctgtttgc tcagaagaaa	3600

20010019645

2001/7/1

tgccatctag tcatgtatgg gctactgctg actctcaaca ttctactcct ccaaaaaaga 3660
agagaaaaggta agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagttt ttgagtcatg 3720
ctgtgttttag taatagaact ctgcgttgct ttgctattta caccacaaag gaaaaagctg 3780
cactgctata caagaaaatt atggaaaaat atttgatgta tagtgccttg actagagatc 3840
ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc 3900
ccccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttgtt ttaacttggtt tattgcagct 3960
tataatggtt acaaataaag caatagcatc acaaattca caaataaagc attttttca 4020
ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat ctatcatgt ctggatcatc 4080
ccgccccatggt atcaacgcca tatttctatt tacagtaggg acctctcgt tgtgttaggt 4140
ccgctgtatt cctagggaaa tagtagggc accttgaact gtctgcatca gccatatagc 4200
cccccgctgtt cgacttacaa acacaggcac agtactgaca aaccatataca cctcctctga 4260
aataccata gttgttaggg ctgtctccga actcattaca ccctccaaag tcagagctgt 4320
aatttcgcca tcaagggcag cgagggcttc tccagataaa atagttctg ccgagagtc 4380
cgtaagggta gacacttcag ctaatccctc gatgaggtct actagaatag tcagtgcggc 4440
tcccattttg aaaattcact tacttgatca gttcagaag atggcggagg gcctccaaaca 4500
cagtaatttt cctcccgact cttaaaatag aaaatgtcaa gtcagttaaag caggaagtgg 4560
actaactgac gcagctggcc gtgcgacatc ctcttttaat tagtgctag gcaacgcct 4620
ccagagggcg tgtggtttg caagaggaag caaaagcctc tccacccagg cctagaatgt 4680
ttccacccaa tcattactat gacaacagct gttttttta gtattaagca gaggccgggg 4740
acccctgggc cggcccgctt actctggaga aaaagaagag aggcatgtt gaggcttcca 4800
gaggcaactt gtcaaaacag gactgcttctt atttctgtca cactgtctgg ccctgtcaca 4860

1020010019645

2001/7/1

aggcccagca cctccataacc cccttaata agcagttgg gaacgggtgc gggcttact	4920
ccgccccatcc cgccccataac tccgcccagt tccgcccatt ctccggccca tggctgacta	4980
attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcgccct ctgagctatt ccagaagtag	5040
tgaggaggct ttttggagg cctaggctt tgcaaaaagc taattcggcg taatctgctg	5100
cttgc当地 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc aagagctacc	5160
aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct	5220
agtgttagccg tagtttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc	5280
tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtctgtc ttaccgggtt	5340
ggactcaaga cgatagttac cggtataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg gggttcgtg	5400
cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg agataacctac agcgtgagca	5460
ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag	5520
ggtc当地 gggacaca ggagagcgca cgagggagct tccagggga aacgcctggt atcttata	5580
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgtatgct cgtcaggggg	5640
gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc aagctagctt ctagctagaa attgtaaacg	5700
ttaatattt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaat cagctcattt tttaaccaat	5760
aggccgaaat cggcaaaatc cttataaat caaaagaata gcccggatata gggttgagtg	5820
ttgttccagt ttgaaacaag agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaaggc	5880
aaaaaaccgt ctatcaggc gatggccgcc cactacgtga accatcaccc aaatcaagtt	5940
tttgggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggAACCC taaagggagc ccccgattt	6000
gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaaagaaa gcgaaaggag	6060
cggcgctag ggcgctggca agttagcgg tcacgctgctg cgttaaccacc acacccggcc	6120

1020010019645

2001/7/1

cgcttaatgc gccgctacag ggccgtact atggttgctt tgacgagacc gtataacgtg	6180
cttcctcgt tggaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg gattttagac	6240
aggaacggta cgccagctgg attaccaaag ggccctcgta tacgcctatt ttataggtt	6300
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc	6360
ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa	6420
taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacattc	6480
cgtgtcgccc ttatccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa	6540
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa	6600
ctggatctca acagcgtaa gatccttgag agtttcgcc ccgaagaacg tttccaatg	6660
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggatttat cccgtttga cgccggcaa	6720
gagcaactcg gtcggccat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc	6780
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc	6840
atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	6900
accgctttt tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaaccggag	6960
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgcagc aatggcaaca	7020
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttccggca acaattaata	7080
gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc	7140
tgtttattt ctgataaattc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggat cattgcagca	7200
ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca	7260
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg	7320
taactgtcag accaagttt ctcataata ctttagattt atttaaaact tcattttaa	7380

1020010019645

2001/7/1

tttctctagc gcgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacgggt	7440
cattagttca tagccatat atggagttcc gcgttacata acttacgta aatggccgc	7500
ctggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtaat aatgacgtat gttccatag	7560
taacgccaat agggacttc cattgacgtc aatgggtgga ctattacgg taaactgcc	7620
acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg	7680
gtaaatggcc cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc	7740
agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcgggtttgg cagtacatca	7800
atggcgtgg atagcggtt gactcacggg gattccaag tctccacccc attgacgtca	7860
atggagttt gtttggcac caaatcaac gggacttcc aaaatgtcgt aacaactccg	7920
ccccattgac gcaaatggc ggtaggcgt tacgggtggaa ggtctatata agcagagctc	7980
tctggctaac t	7991